NIKKOMYCINE
STUDIEN ZUR FERMENTATION UND ISOLIERUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

WOLFGANG DEHLER

aus Höhn (jetzt Neustadt) bei Coburg

1979

NIKKOMYCINE
STUDIEN ZUR FERMENTATION UND ISOLIERUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

WOLFGANG DEHLER

aus Höhn (jetzt Neustadt) bei Coburg

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:		29. März 1979
Dekan	:	Prof. Dr. F. Oberwinkler
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter	:	Privatdozent Dr. H. Wolf

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die großzügige Förderung möchte ich herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. H.-P. Fiedler für die Hilfestellung beim Einarbeiten in die Aufarbeitungstechnik und für die Versuche zur Auftrennung der Nikkomycine mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Bei Herrn Dr. A. Hasenböhler möchte ich mich für die Hilfestellung beim Einarbeiten in die Fermentationstechnik bedanken.

Mein Dank gilt ferner Herrn Professor Dr. W.A. König, Institut für organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg, für die Strukturaufklärung der Nikkomycine.

Der Dank gilt auch Herrn Professor Hagenmaier und Frl. Keckeisen für die große Hilfe bei der Auftrennung und Charakterisierung von Nikkomycin X und Z.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Lehrbereichs Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0058

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	4
1.	Chemikalien	4
2.	Nährmedien	4
2.1.	Medien für Schrägröhrchen, Testplatten und Anzucht	5
2.2.	Medien zur Optimierung	5
3.	Mikroorganismen	6
3.1.	Bakterien	6
3.2.	Pilze	6
4.	Herstellung der Sporensuspension von Testorganismen	7
4.1.	Mucor hiemalis (±)	7
4.2.	Sporulierende Pilze	7
4.3.	Bacillus subtilis	7
5.	Bestimmung des Wirkungsspektrums mit Hilfe des Plattendiffusionstestes	7
5.1.	Sporulierende Pilze	7
5.2.	Nicht sporulierende Pilze	8
5.3.	Saccharomyces, Candida, Schizophyllum	8
5.4.	Bakterien	8
6.	Produktionsstamm und Ausklonen des Stammes	8
7.	Kulturbedingungen	9
7.1.	Schrägröhrchen und Platten	9
7.2.	Anzucht von Sporenkulturen	9
7.3.	Schüttelkolbenversuche	9
7.4.	Temperatur-Versuch	10
7.5.	Fermenterkulturen	10
7.5.1.	10 l-Fermenter	10
7.5.2.	20 l-Fermenter	10
7.5.3.	200 l-Fermenter	11

		Seite
8.	Analyse der Proben	11
8.1.	Bestimmung des Myceltrocken-gewichtes	11
8.2.	Mannitbestimmung	12
8.3.	Stärkebestimmung	13
8.4.	Stickstoffbestimmung im Kulturfiltrat	13
8.5.	Nikkomycinbestimmung	13
8.5.1.	Plattendiffusionstest	13
8.5.2.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	14
8.5.3.	Bestimmung des Nikkomycin Z/X-Verhältnisses	14
9.	Meß- und Regelvorgänge am Fermenter während der Fermentation	14
9.1.	pH-Regelung	14
9.2.	pO_2-Messung	15
9.3.	Bestimmung des Luftvolumens	15
10.	Isolierung und Charakterisierung der Nikkomycine	15
10.1.	Aufarbeitung	15
10.1.1.	Klärung der Kultur mit Filterpresse	15
10.1.2.	Isolierung der Nikkomycine I, Z und X	16
10.1.3.	Isolierung der Nikkomycine B/B_x und C/C_x	17
10.1.4.	Isolierung von Nikkomycin D, E, I und Z/X	17
10.2.	Dünnschichtchromatographie	18
10.3.	Elektrophorese	18
10.4.	Stabilitätstest	19
10.5.	Spektroskopische Untersuchungen	19
10.5.1.	UV-Spektren	19
10.5.2.	IR-Spektren	19
10.6.	Hochdruckflüssigkeitschromatograpie	20
10.6.1.	Chromatographie-Apparat	20
10.6.2.	Säule	20
10.6.3.	Mobile Phase	20
10.6.4.	Probenbereitung	20

Seite

10.7. Uridin-Nucleosidase 21
10.7.1. Isolierung 21
10.7.2. Enzym-Test 21
10.7.3. Papierchromatographie 21

III. ERGEBNISSE 22

1. Optimierung der Fermentation 22
1.1. Ausklonen des Stammes 22
1.2. Fermentation auf bestehendem Medium 22
1.3. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Nikkomycinproduktion 23
1.4. Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Nikkomycinproduktion 24
1.4.1. Ersatz des Sojamehls durch andere Stickstoffquellen 24
1.4.2. Einfluß von organischen Stickstoffquellen bei Anwesenheit von Sojamehl 25
1.4.3. Einfluß von Ammoniumsalzen, Nitrat und Harnstoff 26
1.5. Einfluß von Mineralsalzen auf die Nikkomycinproduktion 27
1.6. Nikkomycinproduktion auf Kohlenhydratgemischen 28
1.6.1. Schüttelkolbenversuch 29
1.6.2. 20 l-Fermenter 30
1.7. Optimierung der Fermentationsbedingungen 30
1.7.1. Belüftung 31
1.7.2. Rührgeschwindigkeit 32
1.7.3. Temperatur 34
1.8. Optimierung der Kohlenhydratkomponenten im Medium 35
1.8.1. Mannit 35
1.8.1.1. Schüttelkolbenversuche 35
1.8.1.2. 20 l-Fermenter 36
1.8.1.3. 200 l-Fermentation 36

		Seite
1.8.2.	Stärke	37
1.8.2.1.	Schüttelkulturen	38
1.8.2.2.	20 l-Fermentation	39
1.9.	Optimierung der Stickstoff-komponenten im Medium	40
1.9.1.	Sojamehl	40
1.9.2.	Hefeextrakt	41
1.10.	Einfluß des pH-Wertes auf die Nikkomycinproduktion	42
1.11.	Steigerung der Hefeextrakt-konzentration im Fermenter	43
1.12.	pH-Regelung im Fermenter mit Schwefelsäure	45
1.13.	Ersatz von Sojamehl durch Soytone und Sojaöl	46
1.13.1.	Schüttelkolbenversuche	47
1.13.2.	Fermentation	49
1.14.	Substratfeeding über Sauer-stoffpartialdruck	52
2.	Isolierung und Charakterisierung	54
2.1.	Isolierung der Nikkomycine I, Z/X	55
2.1.1.	1. Reinigungsschritt	55
2.1.2.	2. Reinigungsschritt	56
2.1.3.	3. und 4. Reinigungsschritt	58
2.2.	Isolierung der Nikkomycine C/C_x, B/B_x, D, E, I, Z/X	59
2.2.1.	1. Reinigungsschritt	60
2.2.2.	Trennung der Nikkomycine C/C_x und B/B_x von den Nikkomycinen D, E, I, Z/X	60
2.2.3.	Trennung und Reinigung von C/C_x und B/B_x	61
2.2.4.	Trennung und Reinigung von D, E, I und Z/X	63
2.3.	Aufarbeitung mit Amberlite IRC-50	64
2.4.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	66
2.5.	Versuche zur Trennung von Nikkomycin X und Z	68
2.5.1.	Uridin-Nucleosidase	68

Seite

2.5.2. Dowex 50WX4 (200-400 mesh) 69
2.6. Strukturformeln der Nikkomycine 70
2.7. Physikalisch-chemische Charakterisierung 70
2.7.1. Dünnschichtchromatographie 70
2.7.2. Papierelektrophorese 72
2.7.3. Stabilitätsverhalten 73
2.7.4. UV-Spektren 74
2.7.5. IR-Spektren 76
2.8. Biologisches Verhalten 79
2.8.1. Wirkungsspektrum 79
2.8.2. Resistenz gegen das eigene Antibiotikum 80

IV. DISKUSSION 81
1. Optimierung 81
2. Isolierung 87

V. ZUSAMMENFASSUNG 91

VI. LITERATURVERZEICHNIS 92

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
ETH	Stammsammlung des Instituts für spezielle Botanik der Eidgenössischen Hochschule, Zürich, Schweiz
GlcNac	N-acetyl-D-glucosamin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
M (g/l)	Myceltrockensubstanz in Gramm/Liter
MeOH	Methanol
MHK	Minimale Hemmkonzentration
N (g/l)	Gesamtstickstoff in Gramm/Liter
Nik (g/l)	Nikkomycingehalt in Gramm/Liter
PAP	Pyridin-Acetat-Puffer
pO_2 (%)	Sauerstoffpartialdruck in Prozent
rpm	Umdrehungen pro Minute
S/t (ml/h)	Substratzugabe/Zeiteinheit
t (h)	Fermentationszeit in Stunden
TÜ	Stammsammlung des Lehrbereichs Mikrobiologie I der Universität Tübingen
vvm	Volumen Luft pro Volumen Nährlösung pro Minute

I. EINLEITUNG

In der Bundesrepublik werden pro Jahr etwa 17000 to Pflanzenschutzmittel produziert und damit 45 % der landwirtschaftlichen Nutzfläche behandelt (Börner, 1975).

Die Benützung von Pflanzenschutzmitteln birgt aber auch Gefahren für die Umwelt. Nachteil vieler chemischer Pflanzenschutzmittel sind a) eine nicht selektive Toxizität, b) Rückstandsprobleme durch nicht abbaubare chemische Substanzen (z.B. DDT, BHC) und c) die Anreicherung in der Nahrungskette.

Umweltfreundliche Pflanzenschutzmittel sollten deshalb eine selektive Toxizität gegen den Zielorganismus besitzen und empfindlich gegen den Abbau durch Photolyse und Bodenmikroorganismen sein.

In dieser Hinsicht scheinen Antibiotika geeignete Substanzen für den Pflanzenschutz zu sein. Die Grenzen ihrer Anwendung sind allerdings bedingt durch die Toleranz oder Resistenz von pathogenen Mikroorganismen, die oft kurze Zeit nach der Anwendung von Antibiotika auftreten (Hori et al., 1974 b). Man hat auf der ganzen Welt versucht, Pflanzenkrankheiten durch den Gebrauch von Antibiotika zu kontrollieren. In westlichen Ländern wurden nur einige Antibiotika für diesen Gebrauch entwickelt. Dies sind Streptomycin (Mitchell et al., 1954), Tetracyclin (Klisiewicz et al., 1961), Cycloheximid (Lenin, Ford, 1960) und Griseofulvin (Brian, 1960).

In Japan wurden Antibiotika in nur begrenztem Maße in der Landwirtschaft eingesetzt, bis die positive Wirkung von Blasticidin S auf den Mehltau des Reises entdeckt wurde (Misato et al., 1959). Diese erfolgreiche Anwendung stimulierte die Entwicklung von landwirtschaftlich verwendbaren Antibiotika und führte zur Entdeckung mehrerer Antibiotika, wie Kasugamycin (Ishiyama et al., 1965), Validamycin (Iwasa et al., 1971) und den Polyoxinen (Isono et al., 1965, 1967, 1968). Blasticidin S und Kasugamycin werden an Stelle von

quecksilberhaltigen, Validamycin und die Polyoxine an Stelle von arsenhaltigen Fungiziden eingesetzt (Misato, 1977).

Eine Übersicht über die in Japan kommerziell verwendeten Antibiotika und ihre Produktion gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Produktion von landwirtschaftlich verwendeten Antibiotika in Japan.

Antibiotikum	Krankheit	verwendete Mengen in Japan (1974) (Tonnen)
Blasticidin S	Rice blast	1355
Kasugamycin	Rice blast	8205
Polyoxin	Rice sheath blight	839
Validamycin	Rice sheath blight	3987

Die Herstellung von Kasugamycin, Validamycin, Blasticidin S und den Polyoxinen ist mittlerweile so wirtschaftlich, daß die Produktionskosten mit denen anderer Pflanzenschutzmittel vergleichbar sind (Perlman, Martin 1977).

Von Höhne (1974) wurde aus dem Kulturmedium von Streptomyces tendae Ettlinger ein Antibiotikum isoliert, das den Namen Nikkomycin erhielt. Die chemische Charakterisierung (Dähn 1975) zeigte, daß es sich um ein Nukleosidantibiotikum handelt, welches große Ähnlichkeit mit den Polyoxinen besitzt. Neben dieser Substanz, in Zukunft als Nikkomycin Z bezeichnet, konnte eine weitere Komponente, Nikkomycin X, nachgewiesen werden. Diese ist mit Nikkomycin Z strukturisomer und enthält an Stelle eines Uracilrestes 4-Formyl-4-imidazolin-2-on (Hagenmaier et al., 1979).

Für Polyoxin D, einer Komponente aus der Polyoxingruppe (Isono et al., 1965, 1967, 1968) ist die Wirkungsweise be-

kannt. Es hemmt bei den untersuchten Pilzen den Einbau von N-Acetyl-D-glucosamin in Chitin (Endo et al., 1970). Die Untersuchungen von Höhne (1974) zeigten, daß es sich bei Nikkomycin um einen kompetetiven Hemmstoff von UDP-GlcNac handelt. Vergleichende Untersuchungen von Polyoxin L und dem Nikkomycin Z/X-Gemisch gegen verschiedene Testorganismen und hinsichtlich der Hemmung der Chitinsynthese von Piricularia orycae zeigten, daß das Nikkomycin Z/X-Gemisch aktiver als Polyoxin L (Isono, 1977) bzw. aktiver als Polyoxin D (Brillinger, 1979; Gooday et al., 1976) ist.

Besonders gute Wirkung zeigt Nikkomycin Z/X gegen Rosterkrankungen an verschiedenen Kulturpflanzen, wie Puccinia-Arten, Uromyces-Arten, gegen Echte Mehltaupilze, wie Erysiphe, gegen Botrytis-Arten, vor allem Botrytis cinerea bei Wein, Erdbeeren und Gemüsekulturen, gegen Sclerotinia-Arten und Sphaerotheca-Arten. Ferner kann es auch gegen Venturia-Arten, Alternaria-Arten, Pellicularia sasakii, Piricularia orycae und Cercospora-Arten eingesetzt werden (Bayer AG, 1977).

Für den Einsatz in der Phytopathologie ist es notwendig, möglichst große Mengen eines Antibiotikums herstellen zu können. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, optimale Bedingungen für die Nikkomycinproduktion zu finden.

Es ist bekannt, daß in vielen Fermentationen die Antibiotika-produzierenden Organismen ein Gemisch chemisch ähnlicher Substanzen synthetisieren. In vielen Fällen wird nur diejenige chemisch charakterisiert, die in größeren Mengen produziert wird. Als Beispiel mag eine Gentamicin-bildende Kultur dienen, die 17 Antibiotika produziert (Maehr, Schaffner, 1967). Streptomyces tendae bildet neben Nikkomycin Z/X noch Ketomycin, Cyclohexenylglycin (König et al., 1975) und eine weitere antibiotisch wirksame Komponente (Langhärig, 1979). Deshalb war es eine weitere Aufgabe dieser Arbeit, die Isolierung von Nikkomycin-verwandten Substanzen zu versuchen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Sofern nicht besonders angeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.

Alcoa Chemicals, Aluminium Company of America	:	A 305
Bio-Rad Laboratories GmbH München	:	Biogel P2
Böhringer, Mannheim	:	Lebensmittelanalytik, Stärke, UV-Test
Brenntag, Mühlheim/Ruhr	:	Niax Polyol LHT 67
Deutsche Maizenawerke, Hamburg	:	Mannit
Deutsche Pharmacia, Frankfurt	:	SP-Sephadex C-25
Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, USA	:	Bacto-Agar Bacto-Corn-meal-Agar Bacto-Soytone Bacto-Casamino acid
Hedinger, Stuttgart	:	Hyphlo Supercel (Celit)
Henselwerke, Magstadt bei Stuttgart	:	Sojamehl vollfett
Hess KG, Stuttgart	:	Sojaöl raffiniert
Oxoid Deutschland, Wesel	:	Yeast extract Malt extract Lab-Lemco-Powder (Fleisch-extrakt)
Sandoz AG, Basel, Schweiz	:	Proflo
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	:	Tween 80 Benzidin x 2 HCl Dowex 50WX4 Amberlite IRC-84 Amberlite IRC-50 Amberlite XAD 2,4,8,12

2. Nährmedien

2.1. Medien für Schrägröhrchen, Testplatten und Anzucht

Medium 1:
(nach Müller 1968)

Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
D-Glucose	4,0 g
Agar	20,0 g
Wasser	1,0 l
pH-Wert	7,3

Medium 2:
(nach Davis-Mingioli 1950)

D-Glucose	5,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
K_2HPO_4	7,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
tri-Na-citrat · $2H_2O$	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
Agar	15,0 g
Aqua deion.	1,0 l

Medium 3:

Corn-meal-Agar	17,0 g
Aqua deion.	1,0 l

2.2. Medien zur Optimierung

Tabelle 2: Verwendete Medien zur Produktion von Nikkomycin

Mediums-komponenten	Medium A	B	C	D	E
Mannit	2	1	3	3	3
Stärke		1	1	1	1
Sojamehl	2	2	2	2	
Hefeextrakt		1	1	2	2
Bacto-Soytone					0,5
Sojaöl					1,5

Konzentrationsangaben in %

3. Mikroorganismen

3.1. Bakterien

Bacillus subtilis Cohn ETH 2016-TÜ 203[5]
Clostridium pasteurianum Winogradsky ATCC 6013[4]
Escherichia coli K_{12}-W 1498 Köln[5]

3.2. Pilze

Alternaria kikuchiana Tanaka CBS 10753 - TÜ 169[3]
Aspergillus fumigatus Fresenius ETH M 3636 - TÜ 149[5]
Botrytis cinerea Persoon ex Friese TÜ 157[2]
Candida albicans (Robin) Beskhout TÜ 164[3]
Formitropsis marginatus 7616[2 +)]
Fusarium solani Appel et Wr. TÜ 156[3]
Heterobasidium annosum 7859[2 +)]
Lepiota pircera 7626[2 +)]
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart et Grigoraki TÜ 282[3]
Mucor hiemalis Wehmer (+) TÜ 179[1]
Mucor hiemalis Wehmer (-) TÜ 180[1]
Mucor miehei Cooney et Emerson ETH M 52 - TÜ 284[5]
Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison var. dairenensis Hasegawa et Banno CBS 4406[2]
Saccharomyces cerevisiae Hansen ETH M 108 - TÜ 125[3]
Saccharomyces cerevisiae S 288 C[3]
Schizophyllum commune [2 +)]
Trametes zonata 7653[2 +)]

[1] Inkubationstemperatur: 20°C
[2] Inkubationstemperatur: 24°C
[3] Inkubationstemperatur: 27°C
[4] Inkubationstemperatur: 30°C
[5] Inkubationstemperatur: 37°C

[+)] Stämme von Dr. T. Anke, Institut für Biologie I, Universität Tübingen

4. Herstellung der Sporensuspensionen von Testorganismen

4.1. Mucor hiemalis (±)

Die Herstellung der Sporensuspension ist bei Kirst (1971) beschrieben.

4.2. Sporulierende Pilze

In 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Medium 1 wurden die Pilzkulturen 10 Tage kultiviert. Mit 50 ml Tweenlösung wurden die Sporen abgeschwemmt, anschließend 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, mit Saline gewaschen, auf eine Extinktion E_{578} = 0,6 eingestellt und in 5 ml Portionen bei -22°C eingefroren. Im Unterschied dazu wurde für Alternaria kikuchiana Medium 3 verwendet.

4.3. Bacillus subtilis

Die Herstellung der Sporensuspension erfolgte nach der Vorschrift von Wolf (1971).

5. Bestimmung des Wirkungsspektrums mit Hilfe des Plattendiffusionstestes

5.1. Sporulierende Pilze

Die Testanordnung war die gleiche wie bei Dähn et al. (1976).

5.2. Nicht sporulierende Pilze

Die Beschreibung des Tests findet sich bei Hütter et al. (1965).

5.3. Saccharomyces, Candida, Schizophyllum

Von den Organismen wurden Schüttelkulturen in Medium 1 (ohne Agar) angesetzt, über Nacht inkubiert, abzentrifugiert, die OD auf 1,3 eingestellt und davon 1 ml entnommen, zu 100 ml auf 45°C abgekühlten Agar (Medium 1) gegeben und 17,5 ml in Petrischalen gegossen.

5.4. Bakterien

Die Testanordnung war die gleiche wie bei Poralla (1967). Es wurde sowohl auf Komplexmedium (Medium 1) als auch auf chemisch definiertem Medium (Medium 2) getestet.

6. Produktionsstamm und Ausklonen des Stammes

Schrägröhrchen mit Medium 1 dienten als Ausgangskultur. Von Sporen der Ausgangskultur wurden Einzelkolonien auf Petrischalen mit Medium 1 nach 10-tägiger Inkubation bei 27°C isoliert. Von den verschiedenen Phaenotypen wurden Einzelkolonien auf Schrägröhrchen und in Submerskultur überimpft und die Nikkomycinproduktion überprüft.

7. Kulturbedingungen

7.1. Schrägröhrchen und Platten

Der Stamm wurde auf Schrägröhrchen mit Medium 1 überimpft, 10 Tage bei 27°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Platten mit Medium 1 wurden zum Isolieren von Einzelkolonien verwendet.

7.2. Anzucht von Sporenkulturen

Eine Submerskultur (Medium A) wurde von Schrägröhrchen beimpft und 48 Stunden bei 27°C auf der Schüttelmaschine inkubiert. Mit 30 ml dieser Kultur wurden Penicillin-Flaschen, die 400 ml Medium 1 enthielten, beimpft. Nach 10-tägiger Inkubation bei 27°C war der Nährboden gleichmäßig mit Streptomyces tendae überwachsen. Die Sporen wurden mit Tween-haltiger Saline (1 Tropfen auf 100 ml Saline) vom Mycel abgelöst und über ein Filter aus Glaswolle filtriert. Die Sporen wurden auf eine Extinktion E_{578} = 0,7 eingestellt und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

7.3. Schüttelkolbenversuche

Alle Versuche zur Untersuchung der Nikkomycinproduktion wurden in Submerskultur durchgeführt. Verwendet wurden 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit einem seitlichen Einstich. Die Füllung der Kolben betrug 100 ml. Alle Kolbenversuche ohne weitere Angaben der Bedingungen wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz) bei 120 rpm mit einem Auslenkradius von 25 mm bei 27°C durchgeführt. Der pH-Wert wurde bei allen Versuchen vor dem Sterilisieren auf 7,5 eingestellt.

7.4. Temperatur-Versuch

Dieser Versuch wurde in rotierenden Schüttelmaschinen (Typ HT, Infors AG, Basel, Schweiz) bei 200 rpm mit einem Auslenkradius von 12 mm durchgeführt. Die Anzucht der Submerskulturen erfolgte bei folgenden Temperaturen: 21°C; 24°C; 27°C; 30°C; 33°C.

7.5. Fermenterkulturen

7.5.1. 10 l-Fermenter

Die Fermenter Modell F-14 (Fa. New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, New Jersey, USA), die 10 l Nährlösung enthielten, wurden mit 5 % einer 48 Stunden alten bei 27°C gewachsenen Vorkultur beimpft und bei gleicher Temperatur inkubiert. Die Schaumbildung wurde durch Zugabe weniger Tropfen einer 50 %igen äthanolischen Polyollösung verhindert. Die Rührgeschwindigkeit betrug 200 rpm, die Belüftung war 0,2 vvm.

7.5.2. 20 l-Fermenter

Die Durchführung der Fermentationen erfolgte in 20 l Fermentern mit Umwurfsystem (Typ b 20, AG für biologische Verfahrenstechnik, Fabrikation und Verkauf in Lizenz Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz). 19 l Nährlösung wurden 30 min bei 121°C in situ sterilisiert. Nach Abkühlen auf Inkubationstemperatur und nachdem die Sauerstoffelektrode einen konstanten Wert anzeigte, wurde der Fermenter mit 1 Liter einer 48-stündigen Vorkultur beimpft. Die Inkubationstemperatur betrug 27°C. Bei Fermentationen ohne Rege-

lung des pH-Wertes erfolgte eine Einstellung des pH-Wertes vor der Sterilisation auf 7,5. Durch Zugabe von 2-3 ml Antischaum vor der Sterilisation konnte die Schaumbildung während der gesamten Fermentationsdauer unterdrückt werden. Sind keine besonderen Angaben gemacht, erfolgt die Fermentation bei einer Belüftung von 0,5 vvm und einer Propellergeschwindigkeit von 1200 rpm.

7.5.3. 200 l-Fermenter

Der 200 l-Fermenter (Typ b 200, AG für biologische Verfahrenstechnik, Basel, Schweiz) wurde mit 180 l Nährlösung beschickt, der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und 30 min bei 121°C sterilisiert. Nach Abkühlen wurde mit 20 l einer 24-stündigen Vorkultur (20 l Fermenter, Typ b 20) beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27°C, 0,4 vvm und 1200 rpm.

8. Analyse der Proben

8.1. Bestimmung des Myceltrockengewichtes

Nach der Probennahme wurden 5 ml abgenutscht und mit 10 ml H_2O gewaschen. Die Filter (MN 615, Ø 4,5 cm, Macherey und Nagel, Düren) waren vor dem Abnutschen über Nacht bei 100°C getrocknet und nach 60 min Temperaturausgleich bei Zimmertemperatur gewogen worden. Nach dem Abnutschen des Mycels wurden die Filter in der gleichen Weise behandelt. Das Mycelgewicht ergibt sich aus der Differenz der beiden Messungen.

8.2. Mannitbestimmung

Die Reaktion besteht aus der Umsetzung von Polyalkoholen mit Perjodat nach folgendem Schema (Malprade 1928):

$$HOH_2C(CHOH)_nCH_2OH + (n+1)HJO_4 \longrightarrow nHCOOH + 2\ HCHO + (n+1)HJO_3 + H_2O$$

Bestimmung des Formaldehyds mittels der Chromotropsäure-reaktion (Auterhoff und Lohmann, 1957):

Ansatz für 20-25 Proben:

$NaJO_4$-Lösung: 10 g $NaJO_4$ mit H_2O zu 100 ml auffüllen

Chromotropsäure-Lösung: 0,375 g Chromotropsäure + 25 ml H_2O

Schwefelsäure 81 %ig: 1 Volumen H_2O + 3 Volumen Schwefelsäure 96 %ig

Schwefelsäure 2N: 17 Volumen H_2O + 1 Volumen Schwefelsäure 96 %ig

In 100 ml Meßkolben:
- 1 ml Probe
- 4 ml $NaJO_4$-Lösung
- 50 ml Wasser
- 10 ml H_2SO_4 2N

mit H_2O auf 100 ml auffüllen und 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen.

In 100 ml Rundkolben:
- 50 ml aus Meßkolben
- 10 ml H_2SO_4 2N

In einer Normschliffapparatur bis zu einem Rest von ca. 5 ml abdestillieren. Das Destillat wird mit Wasser zu 100 ml aufgefüllt.

In Reagenzglas:
- 1 ml Chromotropsäure-Lösung
- 8 ml 81 %ige Schwefelsäure
- 0,8 ml H_2O

Mischen und im Wasserbad auf 80°C erwärmen

- 0,2 ml Destillat

Mischen und für 20 Minuten im Wasserbad von 75-80°C erwärmen

Nach dieser Zeit unter Leitungswasser kühlen und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

Messung im Eppendorf bei E_{578}.
Schichtdicke der Küvetten: 1 cm
Die Erstellung der Manniteichkurve erfolgte mit Manittlösungen verschiedener Konzentration, deren Bestimmung nach den oben angegebenen Bedingungen durchgeführt wurde. Als Leerwert diente ein Ansatz aus 1 ml Chromotropsäure-Lösung, 8 ml 81 %iger H_2SO_4 und 1 ml Wasser.

8.3. Stärkebestimmung

Hinweis zur Testdurchführung:
Eine 1 %ige Stärkelösung wurde 20 min bei 120°C autoklaviert und auf das Ausgangsgewicht mit entionisiertem Wasser geeicht. Von dieser Stärkelösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Bei allen Proben konnte man nur 80 % der Ausgangsmenge feststellen. Deshalb wurden für die Berechnung der Fermentationsproben diese 80 % als Maßstab genommen.

8.4. Stickstoffbestimmung im Kulturfiltrat

Die Durchführung erfolgte nach der Micro-Kjeldahl-Methode mit einer automatischen Destillationseinheit (Tecator, Kjeltec System II,1003 Distilling unit).

8.5. Nikkomycinbestimmung

8.5.1. Plattendiffusionstest

Die Filterrondelle wurden mit 10 µl Testlösung beschickt, auf einer Glasplatte getrocknet und auf die sporenhaltige Agarschicht gelegt. Nach 48-stündiger Inkubation bei Raum-

temperatur und Dunkelheit konnte die Hemmung der Zygosporenbildung ausgemessen und an Hand einer mitgetesteten Eichkurve die Gesamtaktivität bestimmt werden. Mit dieser Methode sind allerdings keine Aussagen über die Produktion der einzelnen Komponenten möglich. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden Nikkomycin Z/X-Lösungen verschiedener Konzentration hergestellt und im Plattendiffusionstest die resultierenden Hemmzonendurchmesser bestimmt.

8.5.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Durchführung siehe II.10.6.

8.5.3. Bestimmung des Nikkomycin Z/X-Verhältnisses

Auf Grund der Aldehyd-Gruppe am Nikkomycin X läßt sich dieses spezifisch mit Dimedon umsetzen. Da das Dimedonderivat von Nikkomycin X praktisch inaktiv gegen Mucor hiemalis (±) ist, kann man die verbleibende Nikkomycin Z-Aktivität bestimmen. 2 ml Kulturfiltrat wurden mit 1 ml einer gesättigten Dimedonlösung versetzt und im Wasserbad auf 70°C erhitzt, worauf man nach dem Abkühlen die Aktivität im Plattendiffusionstest bestimmen konnte.

9. Meß- und Regelvorgänge am Fermenter während der Fermentation

9.1. pH-Regelung

Es wurde eine sterilisierbare Elektrode der Firma Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz, Typ 465-VT, verwendet. Eine genaue

Beschreibung der pH-Regelung ist bei Hasenböhler (1978) zu finden.

9.2. pO_2-Messung

Der Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur wurde mit einer sterilisierbaren Sauerstoffelektrode (Modell IL 531) der Firma Ingold, Urdorf-Zurück, Schweiz, gemessen.

9.3. Bestimmung des Luftvolumens

Die Luftmenge, die während der Fermentation den Fermenter durchströmt, wurde mit einem Laborgasmeter, Typ L5-PVC, der Fa. Wohlgroth, Zürich, Schweiz, ermittelt.

10. Isolierung und Charakterisierung der Nikkomycine

10.1. Aufarbeitung

10.1.1. Klärung der Kultur mit Filterpresse

Die Kultur (20 l-Fermenter) wurde nach Zusatz von 2 % Celit mit einer Mehrschichtenfilterpresse über die Filterschicht C 150 (Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) vorgeklärt. Das Kulturfiltrat wurde mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt und mit einer Mehrschichtenfilterpresse über die Filterschicht U 1000 nachgeklärt.

10.1.2. Isolierung der Nikkomycine I, Z und X

Das klare Kulturfiltrat wird auf eine mit Dowex 50WX4 (50-100 mesh Na^+-Form) gefüllte Säule aufgetragen (Bettvolumen 3 l, Fließgeschwindigkeit 7 l/h). Mit entionisiertem Wasser wäscht man solange, bis die aus der Säule austretende Flüssigkeit völlig farblos ist. Verunreinigungen werden mit 0,01 N NH_3-Lösung und das Nikkomycingemisch mit 0,05 N NH_3-Lösung eluiert. Das biologisch aktive Eluat wird im Vakuum vom Ammoniak befreit und mit Ameisensäure auf pH 5,5 angesäuert.

Das so behandelte Eluat wird auf eine mit Amberlite IRC-84 (Na^+-Form) gefüllte Säule aufgetragen (Bettvolumen 2 l, Fließgeschwindigkeit 5 l/h). Die Säule wird mit der dreifachen Menge des Auftragsvolumens mit Wasser gewaschen. Das an IRC-84 gebundene Material eluiert man mit einem 1N HCOOH/MeOH-Gemisch (1+9) und engt es im Vakuum auf ein kleines Volumen ein.

Das Konzentrat wird auf eine mit SP-Sephadex C-25 (Pyridinium-Form) gefüllte Säule aufgetragen (Bettvolumen 1 l, Fließgeschwindigkeit 100 ml/h). Mit entionisiertem Wasser wird solange gewaschen, bis im UV-Detektor (Uvicord II, LKB, Bromma, Schweden) bei 280 nm keine Absorption mehr angezeigt wird. Mit 0,01 N Pyridin-Acetat-Puffer werden Verunreinigungen und mit 0,05 N Pyridin-Acetat-Puffer (pH 4,7) werden die Nikkomycine I, X und Z eluiert.

Die biologisch aktiven Fraktionen werden vereinigt, im Vakuum vom Puffer befreit, auf ein kleines Volumen eingeengt und in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Das so gewonnene Produkt wird in kleinen Protionen (300-400 mg) gelchromatographisch an Biogel P2 (200-400 mesh, Bettvolumen 1 l, Fließgeschwindigkeit 60 ml/h) gereinigt. Man erhält eine Auftrennung in Nikkomycin I und das natürlich anfallende Nikkomycin Z/X-Gemisch. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt, eingeengt und lyophilisiert.

10.1.3. Isolierung der Nikkomycine B/B_x und C/C_x

Der Durchlauf und das Waschwasser der Amberlite IRC-84 Säule werden vereinigt und auf eine mit Dowex 50WX4 (Na^+-Form, 50-100 mesh) gefüllte Säule aufgetragen (Bettvolumen 700 ml, Fließgeschwindigkeit 3 l/h). Mit 0,01 N NH_3-Lösung werden Verunreinigungen und mit 0,03 N NH_3-Lösung das Nikkomycingemisch eluiert. Die aktiven Eluate werden vereinigt, am Rotationsverdampfer vom Ammoniak befreit, der pH mit Essigsäure auf 4,7 eingestellt und auf eine mit SP-Sephadex C-25 gefüllte Säule (Bettvolumen 500 ml, Fließgeschwindigkeit 100 ml/h) aufgetragen. Die Säule wird mit entionisiertem Wasser solange gewaschen, bis im UV-Detektor bei 280 nm keine Absorption mehr angezeigt wird. Im Durchlauf und im Waschwasser sind die Nikkomycine B/B_x und C/C_x enthalten. Der Durchlauf und das Waschwasser werden vereinigt, auf ein sehr kleines Volumen eingeengt und über Biogel P2 (50-100 mesh, Bettvolumen 1 l, Fließgeschwindigkeit 150 ml/h) chromatographiert. Man erhält eine Auftrennung in Nikkomycin C/C_x und B/B_x. Überlappende Fraktionen werden rechromatographiert. Die weitere Reinigung der Nikkomycine erfolgt dann durch Gelchromatographie an Biogel P2 (100-200 mesh, Bettvolumen 500 ml, Fließgeschwindigkeit 80 ml/h). Zur Gewinnung von Reinsubstanz wird eine Reversed-phase-chromatographie an LiChroPrep RP8 (Korngröße 20-40 µ, Bettvolumen 250 ml, Fließgeschwindigkeit 60 ml/h) durchgeführt. Als Laufmittel dient entionsiertes Wasser.

10.1.4. Isolierung von Nikkomycin D, E, I und Z/X

An der bei 10.1.3. beschriebenen SP-Sephadex C-25 Säule werden die Nikkomycine D, E, I und Z/X gebunden. Mit 0,03 N PAP werden die Nikkomycine D und E in getrennten Peaks und die Nikkomycine I, Z und X in einem gemeinsamen Peak eluiert. Die Nikkomycine D und E können nach Entfernen des Py-

ridin-Acetat-Puffers und Einengen im Vakuum an Biogel P2 (100-200 mesh, Bettvolumen 500 ml, Fließgeschwindigkeit 80 ml/h) gereinigt werden.

Die Nikkomycine I, Z und X können wie unter 10.1.2. beschrieben getrennt und gereinigt werden.

10.2. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden fertige DC-Alufolien und Glasplatten der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Die zu untersuchenden Nikkomycine wurden in folgenden Laufmittelsystemen aufsteigend chromatographiert:

1. Äthanol:Eisessig:Wasser	4:1:1	Cellulose
2. Propanol:Wasser	8:2	Cellulose
3. Butanol:Pyridin:Wasser	1:1:1	Kieselgel

Der Nachweis der Nikkomycine auf den Dünnschichtplatten erfolgte durch:

1. Besprühen der DC-Platten mit Ninhydrin
2. Bioautographie auf Mucor hiemalis (±) nach der bei Kirst (1971) beschriebenen Methode.
3. Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin
4. Begutachtung der Substanzflecken unter der UV-Lampe.

10.3. Elektrophorese

Es wurden Papierstreifen (MN 212, Macherey, Nagel & Co., Düren) von 3 cm Breite und 30 cm Länge geschnitten und eine Niederspannungselektrophorese (140 V, 1 Stunde) mit einer einfachen Trennkammer der Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg, durchgeführt. Zur Lokalisierung der Substanzen wurden die Papierstreifen der Länge nach halbiert und zum einen mit Ninhydrin behandelt, zum anderen der Bioautographie unterworfen.

10.4. Stabilitätstest

Es wurden verschiedene Lösungen (siehe III.2.7.3.) hergestellt und je 1 mg Substanz in 1 ml gelöst. Diese wurden in 2 Ansätzen jeweils bei $4^{o}C$ und $22^{o}C$ aufbewahrt und täglich auf ihre antibiotische Aktivität getestet.

10.5. Spektroskopische Untersuchungen

10.5.1. UV-Spektren

Die Absorptionsspektren der Nikkomycine wurden in einem Spektralphotometer der Fa. Beckmann (DB-GT) aufgenommen. Es wurden Lösungen hergestellt, die 50 µg Substanz in 1 ml 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH enthielten. Die Messung erfolgte in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke.

10.5.2. IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektrograph, Modell 137,in KBr aufgenommen (1 mg Substanz mit 300 mg KBr vermischt und zur Tablette gepreßt).

10.6. Hochdruckflüssigkeitschromatographie[1)]

10.6.1. Chromatographie-Apparat

Knauer (Berlin, BRD) FR-30 Pumpe, Rheodyne (Berkeley, Calif., USA) Modell 7105 Valve Injector, Knauer (Berlin, BRD) Modell 8100 Spektralphotometer Detektor, Hewlett-Packard (Palo Alto, Calif., USA) Integrator Modell 3080 A.

10.6.2. Säule

Eine rostfreie Stahlsäule (25 cm 4,6 mm I.D., Knauer) wurde mit Merck LiChrosorb RP-8 (10 µ) mit der "balanced density" Methode gepackt. Die Zahl der theoretischen Böden war annähernd 5000 pro Säule, im Vergleich zu Nitrobenzen im System Wasser:Acetonitril (6:4).

10.6.3. Mobile Phase

30 mM Ammoniumacetat wurde mit Ammoniaklösung auf pH 7,0 eingestellt. Die Fließrate betrug 2 ml/min, der Druck 50 bar.

10.6.4. Probenbereitung

Das Fermentationsmedium wurde zentrifugiert und der Überstand, der die Nikkomycine enthielt, wurde mit einem Membranfilter (Schleicher und Schüll, Kassel, BRD; Porendurchmesser 0,6 µ) filtriert.

---

[1] Entwicklung von Dr. H.P. Fiedler, Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität Tübingen.

10.7. Uridin-Nucleosidase

10.7.1. Isolierung

Saccharomyces cerevisiae S 288 C wurde in Medium 1 ohne Agar angezüchtet. Die feucht abgewogene Hefepaste wurde im Mörser bei $0^{o}C$ - $4^{o}C$ mit dem dreifachen Gewicht Alcoa A 305 5 min zerrieben, anschließend mit dem dreifachen Volumen 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 (10^{-3} M EDTA enthaltend) 5 min durch weiteres Reiben extrahiert und 45 min bei 34000 g zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde bei $-20^{o}C$ eingefroren (Cennano et al., 1964).

10.7.2. Enzym-Test

Verschiedene Konzentrationen von Nikkomycin Z/X und Uridin wurden in 1 ml Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst und mit 0,2 ml Enzymlösung versetzt. Die Mischungen wurden bei $38^{o}C$ über 30 min inkubiert. Der Verlauf der Nikkomycinaktivität wurde mit Hilfe des Plattendiffusionstestes und der Dimedonreaktion verfolgt. Das Verhalten von Uridin wurde an Hand der Papierchromatographie überprüft.

10.7.3. Papierchromatographie

Es wurde Chromatographiepapier von Macherey, Nagel & Co. (Düren) MN 214, verwendet. Als Laufmittel diente folgendes System:
4 Teile Butanol, 1 Teil Äthanol, gesättigt mit H_2O (mit gleichem Volumen H_2O schütteln und wässrige Phase verwerfen). (Carter, 1951).
Der Nachweis der Substanzen erfolgte mit UV-Licht (Uridin, Uracil) und mit Benzidin-Sprühreagenz (Ribose).

III. ERGEBNISSE

1. Optimierung der Fermentation

1.1. Ausklonen des Stammes

Mit dem unter II.6. angeführten Überprüfungsschema sollte getestet werden, ob Streptomyces tendae (TÜ 901) aus phaenotypisch unterscheidbaren Individuen besteht, und ob sich diese Phaenotypen auch in der Nikkomycinproduktion unterscheiden. Insgesamt ließen sich 5 verschiedene Phaenotypen isolieren. Bei der Überprüfung der Kolonien jeden Typs auf Nikkomycinproduktion in Submerskultur (Medium A) erwiesen sich die Kolonien mit weißem Luftmycel als die besten Antibiotikaproduzenten. Die am besten produzierende Einzelkolonie (0,7 mg/ml) diente als Ausgangsmaterial für alle weiteren Versuche. Es stellte sich im Laufe der Arbeit heraus, daß die geklonte Kolonie sich nach mehrmaligem Überimpfen auf Schrägröhrchen wieder in die einzelnen Typen aufspaltete. Deshalb war es nötig, den Stamm nach mehreren Wochen neu auszuklonen.

1.2. Fermentation auf bestehendem Medium

Die gebräuchlichen Nährlösungen des Instituts für Mikrobiologie, Tübingen, wurden bereits von Höhne (1972) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Nikomycinproduktion getestet. Dabei erwies sich Nährlösung 19 (= Medium A) als die geeigneteste.

Eine im 10 l-Maßstab durchgeführte Fermentation führte zu folgendem Ergebnis:

Mycelgewicht: 12,5 g/l
Nikkomycinproduktion: 0,75 g/l

Im 10 l-Fermenter zeigte der Stamm das gleiche Verhalten und die gleiche Nikkomycinproduktion wie im Kolbenversuch. In der folgenden Optimierung der Nährlösung dient Medium A als Ausgangsposition.

1.3. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Nikkomycinproduktion

Das in Medium A enthaltene Mannit wird durch andere Kohlenstoffquellen ersetzt (8 gC/l) und der Einfluß auf die Nikkomycinproduktion im Schüttelkolbenversuch getestet. Der Nikkomycingehalt des Kulturfiltrates am 4. und 6. Tag sowie die pH-Werte der verschiedenen Submerskulturen sind in Tabelle 3 aufgezeigt.

Tabelle 3: Einfluß verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Nikkomycinproduktion bei 2 % Sojamehl als Stickstoffquelle

Kohlenstoffquelle	4. Tag		6. Tag	
	Nik. (g/l)	pH	Nik. (g/l)	pH
Mannit	0,50	5,9	0,75	5,3
Stärke	0,36	6,1	0,60	5,4
Glucose	0,36	6,0	0,60	5,4
Glycerin	0,20	6,6	0,48	5,6
Lactose	0,15	6,5	0,35	5,7

Die Nikkomycinbildung im Schüttelkolben war am besten mit Mannit als Kohlenstoffquelle, danach folgten Stärke und Glucose.

1.4. Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Nikkomycinproduktion

1.4.1. Ersatz des Sojamehls durch andere Stickstoffquellen

Sojamehl ist eine billige Stickstoffquelle und in der Produktion von Antibiotika weit verbreitet, besitzt aber den Nachteil, daß es unlösliche Bestandteile aufweist, die eine saubere Fermentationsanalyse behindern. Deshalb wurden andere Stickstoffquellen auf ihren Einfluß auf die Nikkomycinbildung getestet. Am 4. und 6. Tag wurden Nikkomycingehalt und pH-Wert gemessen. Die Ergebnisse in Tabelle 4 sind Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelkolben.

Tabelle 4: Einfluß verschiedener stickstoffhaltiger Substrate auf die Nikkomycinproduktion bei 2 % Mannit als C-Quelle

Stickstoffquelle	Konzentration in %	4. Tag		6. Tag	
		Nik. (g/l)	pH	Nik. (g/l)	pH
Sojamehl	2	0,50	5,7	0,75	5,2
Pepton	2	<0,01	8,4	<0,01	8,7
Hefeextrakt	2	0,01	8,8	<0,01	8,9
Lab-Lemco	2	0,01	7,6	<0,01	7,5
Trypton	2	<0,01	8,6	0,0	8,8
Proflo	2	0,0	7,8	0,0	8,0
Casamino acid	2	0,03	7,6	0,05	7,7

Keine der getesteten Stickstoffquellen ist unter diesen Versuchsbedingungen in der Lage, das Sojamehl zu ersetzen. Die Nikkomycinproduktion geht in allen Fällen drastisch zurück.

Auffällig ist, daß in sämtlichen schlecht produzierenden Ansätzen der pH-Wert nach mehreren Tagen Inkubation im alkalischen Bereich liegt, während bei Sojamehl als N-Quelle der pH-Wert in den schwach sauren Bereich absinkt.

1.4.2. Einfluß von organischen Stickstoffquellen bei Anwesenheit von Sojamehl

Wie der vorhergehende Versuch zeigt, ist das Verhalten des pH-Wertes mitentscheidend für eine gute Nikkomycinproduktion. Die zuletzt eingesetzten Stickstoffquellen werden nochmals bei Anwesenheit von Sojamehl in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet, in der Hoffnung, daß der pH-Wert nicht in den alkalischen Bereich absinkt. Am 4. und 6. Tag wurden pro Ansatz 3 Kolben auf Nikkomycingehalt und pH-Wert untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Gegenüber dem vorhergehenden Versuch ist die Nikkomycinbildung in den vergleichbaren Ansätzen besser. Das beste Ergebnis konnte bei einem Zusatz von 1 % Hefeextrakt erreicht werden. In diesem Fall wurde nicht nur die maximale Produktion gesteigert, sondern auch die Fermentationsdauer verringerte sich um 2 Tage auf ca. 100 Stunden. Der Versuch zeigt ebenfalls den Einfluß des pH-Wertes auf die Nikkomycinproduktion. Der Zusatz von 2 % Hefeextrakt hat ein Absinken des pH-Wertes in den alkalischen Bereich zur Folge, bei gleichzeitiger Verringerung der Nikkomycinbildung.

Tabelle 5: Einfluß von organischen Stickstoffquellen auf die Nikkomycinproduktion bei Anwesenheit von Sojamehl

Substanz	Konzentration %	4. Tag		6. Tag	
		Nik. (g/l)	pH	Nik. (g/l)	pH
Kontrolle[a)]		0,50	5,8	0,75	5,3
Hefeextrakt	1	0,90	5,1	0,90	5,7
Hefeextrakt	2	0,60	7,6	0,45	7,9
Pepton	1	0,50	5,4	0,35	5,6
Pepton	2	0,02	6,8	0,01	7,3
Lab Lemco	1	0,10	6,1	0,50	5,9
Lab Lemco	2	0,15	6,1	0,45	6,1
Trypton	1	0,05	8,2	0,10	8,5
Trypton	2	0,10	8,5	0,10	8,8
Proflo	1	0,08	7,5	0,07	8,1
Proflo	2	0,01	7,9	0,01	8,3
Casamino acid	1	0,45	6,0	0,60	5,8
Casamino acid	2	0,30	7,1	0,25	7,5

a) Medium A

1.4.3. Einfluß von Ammoniumsalzen, Nitrat und Harnstoff

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener anorganischer Stickstoffquellen auf die Nikkomycinbiosynthese erfolgte in Schüttelkolben. Der Nikkomycingehalt sowie der pH-Wert wurden am 4. und 6. Tag bestimmt. Die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelkolben sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die Anreicherung des Kontrollmediums mit Nitrat, Harnstoff oder Ammoniumsalzen führte in allen Fällen zu einer Erniedrigung des Antibiotika-Titers.

Tabelle 6: Einfluß von Ammoniumsalzen, Nitrat und Harnstoff auf die Nikkomycinbiosynthese

Substanz	Konzentration %	4. Tag Nik. (g/l)	4. Tag pH	6. Tag Nik. (g/l)	6. Tag pH
Kontrolle[a)]		1,20	5,9	1,00	7,5
$NaNO_3$	1	0,40	5,7	0,50	7,3
	2	0,15	5,8	0,30	7,1
NH_4Cl	1	0,15	6,0	0,30	5,7
	2	0,01	7,4	0,01	7,5
$(NH_4)_2SO_4$	1	0,33	5,6	0,65	5,5
	2	0,02	6,6	0,13	6,6
$(NH_2)_2CO$	1	0,75	5,9	1,05	6,5
	2	0,25	7,7	0,05	7,3

[a)] Medium B

1.5. Einfluß von Mineralsalzen auf die Nikkomycinproduktion

Anorganische Mineralsalze, aufgeführt in Tabelle 7, werden dem Medium in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Der Nikkomycingehalt und der pH-Wert werden am 4. und 6. Tag als Mittelwert aus jeweils 3 Parallelkolben bestimmt.

Bei Zugabe von Mineralsalzen resultierte in allen Fällen eine Erniedrigung der Antibiotikaproduktion. In den Ansätzen, die Phosphat enthielten, konnte ein stärkeres Wachstum festgestellt werden, aber keine Produktionssteigerung.

Tabelle 7: Wirkung von Mineralsalzen auf die Produktion von Nikkomycin

Mineralsalz	Konzentration %	4. Tag Nik. (g/l)	4. Tag pH	6. Tag Nik. (g/l)	6. Tag pH
KH_2PO_4	0,2	1,00	5,9	0,60	7,3
	0,4	0,80	5,8	0,65	6,5
	1,0	0,40	5,7	0,30	6,3
K_2HPO_4	0,2	0,65	6,0	0,70	7,0
	0,4	0,50	6,3	0,80	6,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,65	5,4	1,10	6,7
	0,5	0,65	5,3	1,00	7,0
	1,0	0,30	5,1	0,80	5,4
NaCl	0,2	0,50	5,7	0,70	7,1
	0,5	0,65	5,4	0,30	7,5
	1,0	0,35	5,5	0,30	7,2
$CaCO_3$	0,2	0,06	6,6	0,80	6,2
	0,4	0,05	7,0	0,65	6,9
	0,6	0,04	7,1	0,35	7,0
Kontrolle[a)]		1,30	5,9	1,00	6,8

a) Medium B

1.6. Nikkomycinproduktion auf Kohlenhydratgemischen

Isono et al. (1965, 1967) benützten zur Produktion der Polyoxine verschiedene Kohlenhydrat-Gemische als Kohlenstoffquelle. Die Auswirkung auf die Nikkomycinbildung wird im folgenden Versuch getestet.

1.6.1. Schüttelkolbenversuch

Das in den bisherigen Medien enthaltene Mannit wird durch entsprechende Mengen (2 %/l) von Kohlenhydratmischungen ersetzt. Als Kohlenstoffquelle wurden diejenigen Substanzen ausgewählt, die im Versuch III.1.3. die besten Ergebnisse zeigten. Der Nikkomycingehalt des Kulturfiltrates am 4. und 6. Tag sowie die pH-Werte der verschiedenen Submerskulturen sind in Tabelle 8 aufgezeigt.

Tabelle 8: Nikkomycinproduktion auf Kohlenhydratgemischen

Kohlenhydratgemisch	Konzentration %	4. Tag Nik. (g/l)	4. Tag pH	6. Tag Nik. (g/l)	6. Tag pH
Glucose Stärke	1+1	0,80	6,0	0,60	7,5
Glucose Mannit	1+1	0,80	5,8	0,65	7,3
Mannit Stärke	1+1	1,20	5,6	1,0	7,2
Kontrolle[a)]		0,90	5,3	0,80	5,5

a) Medium A + 1 % Hefeextrakt

Die Mischung aus Mannit und Stärke zeigte den besten Antibiotika-Titer. Die Ansätze mit Glucose blieben dagegen in der Produktion zurück. Mit dem Ergebnis von 1,2 g/l lohnte es sich, in den 20 l-Fermenter überzugehen.

1.6.2. 20 l-Fermenter

Mit dem im vorhergehenden Versuch gewonnenen Medium (= Medium B) wurde eine Fermentation im 20 l-Maßstab durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Nikkomycinproduktion die gleiche Höhe erreicht.

Fermenter I

Fermentationsbedingungen:
Umwurfsystem: 800 rpm
Belüftung: 0,3 vvm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 15 g/l
Maximale Produktion: 0,5 g/l
Fermentationsdauer: 96 h

Die Produktion im 20 l-Fermenter blieb deutlich hinter den Ergebnissen der Schüttelkolbenversuche zurück. Dies deutet darauf hin, daß die optimalen Fermentationsbedingungen durch die gewählten Parameter nicht erfüllt sind. In weiteren Versuchen wird deshalb zu klären sein, bei welchen Betriebsbedingungen eine optimale Produktion erreicht wird.

1.7. Optimierung der Fermentationsbedingungen

Eine wichtige Rolle bei aeroben Fermentationsprozessen spielt der Sauerstoff. Eines der Probleme ist der Transfer des schwerlöslichen Sauerstoffs von der Luft durch Gas- und Flüssigkeitsgrenzschichten in die Flüssigkeitsphase und von dort in die Region der Zellwände (Bartholomew, 1960). Auf Grund seiner geringen Löslichkeit ist der Sauerstoff in vielen Prozessen der limitierende Faktor. Ein anderes Problem ist die homogene Mischung des Mediums, die für einen konstanten Stoff- und Wärmetransport sorgen soll. Die Va-

riation dieser beiden Bedingungen - Belüftung und Rühren - auf die Nikkomycinproduktion wird im folgenden untersucht.

1.7.1. Belüftung

Die Versuche wurden im 20 l-Fermenter durchgeführt, wobei alle Bedingungen, bis auf die Belüftung, konstant gehalten wurden. Die Propellergeschwindigkeit betrug 800 rpm. Als Nährlösung wurde Medium C verwendet.

Fermenter II

Fermentationsbedingungen:
Belüftung: 0,3 vvm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 15 g/l
Maximale Produktion: 0,5 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Fermenter III

Fermentationsbedingungen:
Belüftung: 0,4 vvm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 15 g/l
Maximale Produktion: 0,5 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Fermenter IV

Fermentationsbedingungen:
Belüftung: 0,5 vvm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 15 g/l
Maximale Produktion: 0,6 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Die Erhöhung der Belüftung führte nur bei Fermentation IV zu einer geringfügig verbesserten Produktion. Das Wachstum der Kultur und die Fermentationszeit wurden durch die Variation dieses Parameters nicht beeinflußt.

1.7.2. Rührgeschwindigkeit

Die folgenden Fermentationen wurden bei einer konstanten Belüftung von 0,5 vvm durchgeführt.

Fermenter V

Fermentationsbedingungen:
Propeller: 1000 rpm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 16 g/l
Maximale Produktion: 0,75 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Fermenter VI

Fermentationsbedingungen:
Propeller: 1200 rpm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 18 g/l
Maximale Produktion: 1,3 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Mit dieser Fermentation wurde das bisher beste Ergebnis im Fermenter erzielt. Die Erhöhung der Propellergeschwindigkeit sorgte für eine gute und schnelle Durchmischung des Mediums, wodurch eine Steigerung des Mycelwachstums und fast eine Verdopplung der Produktion gegenüber Fermenter V zu verzeichnen war. Durch Variation der Tourenzahl konnte eine Veränderung im Aussehen des Pellets nicht festgestellt

werden. In Abbildung 1 ist die Mannitverwertung der Fermentationen IV, V und VI dargestellt.

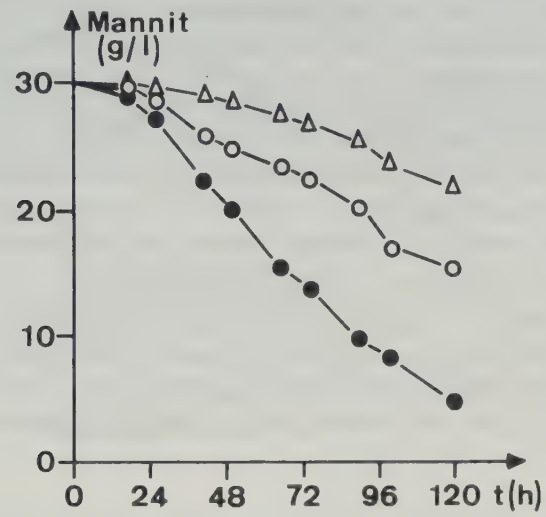


Abb. 1: Mannitverwertung während der Fermentation
Δ-Δ Fermentation IV
o-o Fermentation V
●-● Fermentation VI

Die Fermentationen mit geringerer Propellerumdrehung als 1200 rpm weisen einen deutlich geringeren Mannitverbrauch auf. Durch die bessere Durchmischung des Mediums bei höherer Propellergeschwindigkeit wird den Zellen der für die Substratumsetzung dringend benötigte Sauerstoff geliefert, was sich in einer besseren Verwertung des Mannits äußert.

1.7.3. Temperatur

Ein weiterer Faktor von Betriebsbedingungen, die eine Fermentation beeinflussen, ist die Temperatur. Keinesfalls muß die optimale Temperatur für ein maximales Wachstum der Kultur auch gleichzeitig die optimale Temperatur für eine gute Antibiotika-Produktion sein. Beim Vorhandensein einer negativen Korrelation zwischen Wachstum und Antibiotika-Produktion könnte sich durch Veränderung der Temperatur ein suboptimales Wachstum erreichen lassen, was möglicherweise zu einer Produktionssteigerung führen könnte.

Die Durchführung des Versuches erfolgte in Schüttelkolbenkulturen. Verwendet wurde Medium B. Am 4. und 6. Tag wurden Nikkomycingehalt und pH-Wert bestimmt. Die Ergebnisse aus jeweils 3 Parallelkolben sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Einfluß der Temperatur auf die Nikkomycinproduktion

Inkubationstemperatur °C	4. Tag		6. Tag	
	Nik. (g/l)	pH	Nik. (g/l)	pH
21	0,03	7,5	0,2	7,15
24	0,65	6,9	0,6	6,1
27	0,95	5,8	1,0	5,8
30	0,50	5,7	0,6	6,0
33	0,15	5,7	0,2	6,3

Die Nikkomycinbiosynthese erfolgte im gesamten Temperaturbereich, der getestet wurde. Temperaturen unter und über 27°C führten zu einer geringeren Produktion.

1.8. Optimierung der Kohlenhydratkomponenten im Medium

1.8.1. Mannit

Ausgehend von Medium B wurden in den folgenden Versuchen die Konzentrationen der Mediumsbestandteile variiert und ihre Wirkung auf die Nikkomycinproduktion verfolgt.

1.8.1.1. Schüttelkolbenversuche

Am 4. und 6. Tag wurden pro Ansatz 3 Kolben auf Nikkomycingehalt und pH-Wert untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: Abhängigkeit von Mannitkonzentration und Nikkomycinproduktion

Mannitkonzentration %	4. Tag Nik. (g/l)	4. Tag pH	6. Tag Nik. (g/l)	6. Tag pH
1	1,3	5,8	1,1	7,3
2	1,7	5,6	1,9	5,5
3	1,8	5,7	2,0	5,5
4	1,8	5,7	2,0	5,4
8	1,0	5,7	1,3	5,5

Durch die Erhöhung der Mannitkonzentration läßt sich im Schüttelkolben eine Steigerung der Nikkomycinproduktion auf ca. 2 g/l erreichen. Die Verwendung von 3 oder 4 % Mannit führt zum gleichen Ergebnis, 2 % Mannit ist in der Gesamtproduktion nur geringfügig schlechter.

1.8.1.2. 20 l-Fermenter

Bei der folgenden 20 l-Fermentation mit 4 % Mannit sollte überprüft werden, ob sich die Ausbeute im Fermenter durch höhere Mannitkonzentrationen, im Gegensatz zum Kolbenversuch, steigern läßt.

Fermenter VII

Fermentationsbedingungen:
Belüftung: 0,5 vvm
Propeller: 1200 rpm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 18 g/l
Maximale Produktion: 1,3 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Das Ergebnis zeigt, daß auch im Fermenter höhere Mannitkonzentrationen keine Steigerung der Produktion bewirken. Sowohl bei Fermenter VI (3 % Mannit) als auch bei Fermenter VII (4 % Mannit) waren die Ausbeuten bei gleichen Bedingungen identisch.

Diese beiden Fermentationen zeigen außerdem, daß die Nikkomycinproduktion im Fermenter nur maximal 2/3 der Produktion im Schüttelkolben erreicht.

1.8.1.3. 200 l-Fermentation

Zur Bereitstellung größerer Mengen Nikkomycins war es nötig geworden, eine 200 l-Fermentation durchzuführen. Als Nährlösung diente Medium C. Die Fermentationsbedingungen finden sich bei II.7.5.3.

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 19,5 g/l
Maximale Produktion: 1,5 g/l
Fermentationsdauer: 100 h

Im Vergleich zum 20 l-Fermenter zeigte die Kultur ein stärkeres Wachstum, eine leicht erhöhte Antibiotika-Produktion und eine verkürzte Fermentationszeit. Der Grund für dieses Verhalten könnte darin liegen, daß in kleinen Fermentern die Löslichkeit des Sauerstoffs an der Oberfläche der Nährlösung fast zur Hälfte der gesamten Sauerstofflöslichkeitsrate beiträgt, während in großen Fermentern dieser Beitrag vernachlässigbar ist (Hockenhull, 1975). Eine andere Möglichkeit für dieses Verhalten könnte im verwendeten Impfmaterial für den 200 l-Fermenter liegen. Zum einen beträgt die Impfmenge im 200 l-Fermenter 10 %, im 20 l-Fermenter dagegen 5 %, zum anderen wird der 200 l-Fermenter mit einer 24 Stunden alten 20 l-Fermenterkultur beimpft, deren physiologischer Zustand homogener ist als die Schüttelkolbenvorkulturen für die 20 l-Fermenter.

1.8.2. Stärke

Die Steigerung der Mannitkonzentration führte zu einer besseren Nikkomycinproduktion. In den folgenden Versuchen wurde die Änderung der Stärkekonzentration hinsichtlich ihres Einflusses auf die Nikkomycinproduktion getestet. Isono und Mitarbeiter (1967, 1975) benützten zur Fermentation der Polyoxine Medien mit hohen Stärkeanteilen.

1.8.2.1. Schüttelkulturen

Als Grundmedium fand Medium B Verwendung. Die Ergebnisse in Tabelle 11 sind Mittelwerte aus 3 Parallelkolben.

Tabelle 11: Nikkomycinbildung in Abhängigkeit der Stärkekonzentration

Stärkekonzentration %	4. Tag		6. Tag	
	Nik. (g/l)	pH	Nik. (g/l)	pH
1	1,3	5,8	0,65	8,1
2	1,5	5,7	1,0	6,9
3	1,0	5,5	1,5	5,7
4	1,1	5,5	1,2	5,5
8	0,8	5,2	1,0	5,2
Kontrolle[a)]	1,8	5,6	2,1	5,5

[a)] Medium C

Das beste Ergebnis zeigte sich bei Verwendung von 2 % Stärke, wobei aber die maximale Produktion hinter den Mannit-Versuchen zurückblieb. Die Ansätze mit mehr als 2 % Stärke sind im Kolbenversuch nicht vergleichbar, da die verwendete Stärke in diesen Konzentrationen nur bedingt löslich ist und nach dem Autoklavieren eine schwer lösliche Stärkeschicht den Kolbenboden besetzte. Um dies zu vermeiden, wurde in Fermentationen mit höherer Stärkekonzentration die Nikkomycinproduktion getestet.

1.8.2.2. 20 l-Fermentation

Fermenter VIII

Fermentationsbedingungen:
Stärkekonzentration: 3 %
Belüftung: 0,5 vvm
Propeller: 1200 rpm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 19 g/l
Maximale Produktion: 1,3 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Fermenter IX

Fermentationsbedingungen:
Stärkekonzentration: 6 %
Belüftung: 0,5 vvm
Propeller: 1200 rpm

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 26 g/l
Maximale Produktion: 1,2 g/l
Fermentationsdauer: 144 h

Die Ergebnisse zeigen, daß auch mit höherer Stärkekonzentration keine Ausbeutesteigerungen zu erreichen sind. Für die Gesamtaktivität ist es unerheblich, ob das Medium 3 % Mannit (Fermenter VI) oder 3 % Stärke (Fermenter VIII) enthält. Eine weitere Erhöhung der Stärke führte aber zu einer Verlängerung der Fermentationszeit und zu einem ungewöhnlich hohen Mycelgewicht von 26 g/l. Die Nikkomycinproduktion war nur geringfügig schlechter.

1.9. Optimierung der Stickstoffkomponenten im Medium

Durch Konzentrationsänderungen der stickstoffhaltigen Komponenten wurde das C/N-Verhältnis variiert. Das als Nährlösung verwendete Medium C enthält ca. 9 g C/l (aus Mannit, Stärke und Sojamehl). Sojamehl enthält etwa 6 % N (Young and Wood, 1974), Hefeextrakt 10 % N (Oxoid, 1972); damit ergibt sich ein Gesamtstickstoffgehalt von ca. 1,5 g/l, das C/N-Verhältnis beträgt somit 9:1,5.

1.9.1. Sojamehl

pH-Wert und Nikkomycingehalt werden am 4. und 6. Tag getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Tabelle 12: Einfluß verschiedener Sojamehlkonzentrationen auf die Nikkomycinproduktion

Sojamehl-konzentration %	4. Tag		6. Tag	
	Nik. (g/l)	pH	Nik. (g/l)	pH
0	0,05	7,5	0,08	7,6
0,5	0,30	6,8	0,40	6,7
1,0	1,20	5,8	1,50	5,4
1,5	1,10	5,8	1,80	5,4
2,0	1,80	5,7	2,20	5,5
3,0	1,50	5,6	2,00	5,5
4,0	0,50	5,9	1,10	5,8

Als optimal erwies sich 2 % Sojamehl, wie es schon von Anfang an im Medium verwendet wurde.

1,9.2. Hefeextrakt

Hefeextrakt enthält einen hohen Anteil an Nukleotiden, Nukleosiden, Purinen und Pyrimidinen. Diese Substanzen spielen eine zentrale Rolle in der komplizierten Regulation des Nukleotidstoffwechsels. Bestandteile des Hefeextraktes könnten durchaus als Precursorsubstanzen für die Nikkomycine in Frage kommen. Durch Optimierung der Hefeextraktkonzentration sollte vielleicht auch eine Steigerung der Nikkomycinproduktion möglich sein. Die Ergebnisse in Tabelle 13 geben die Bestimmung des pH-Wertes und den Nikkomycingehalt am 4. und 6. Versuchstag aus jeweils 3 Parallelkolben wieder.

Eine Verringerung der Hefeextraktkonzentration führt in allen Fällen zu einer Abnahme der Nikkomycinbildung. Bei Steigerung der Hefeextraktkonzentration über 1 % nimmt die Nikkomycinproduktion ebenfalls ab. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, daß der pH-Wert im neutralen Bereich verbleibt, was in den bisherigen Fällen immer zu einer geringeren Produktivität führte.

Tabelle 13: Einfluß verschiedener Hefeextraktkonzentrationen auf die Nikkomycinproduktion

Hefeextrakt-konzentration %	4. Tag		6. Tag	
	Nik. (g/l)	pH	Nik. (g/l)	pH
0	0,8	5,4	1,0	5,0
0,25	1,3	5,5	1,5	5,1
0,50	1,3	5,6	1,7	5,1
0,75	1,7	5,5	2,0	5,0
1,00	1,8	5,6	2,2	5,4
1,50	1,1	6,4	1,2	6,0
2,00	0,8	7,3	0,6	7,7

Durch Beeinflussung des pH-Wertes läßt sich dieser Effekt verhindern. In den nächsten Versuchen wurde deshalb im Fermenter der Einfluß des pH-Wertes auf die Nikkomycinproduktion untersucht.

1.10. Einfluß der pH-Wertes auf die Nikkomycinproduktion

Mit 3 N NaOH und 3 N H_3PO_4 wurde der pH-Wert ± 0,1 pH-Einheiten konstant geregelt. Die Fermentationsbedingungen waren identisch mit Fermenter VII (III.1.8.1.2.), als Nährlösung diente Medium C.

Fermenter X

Fermentationsbedingungen:
pH-stat.: 7,5 ± 0,1

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 34 g/l
Maximale Produktion: 0,4 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Fermenter XI

Fermentationsbedingungen:
pH-stat.: 6,5 ± 0,1

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 28 g/l
Maximale Produktion: 0,8 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Fermenter XII

Fermentationsbedingungen:
pH-stat.: 5,5 ± 0,1

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 26 g/l
Maximale Produktion: 1,15 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Mit konstantem pH-Wert bei 5,5 konnte in dieser Fermentationsreihe das beste Ergebnis erzielt werden. In sämtlichen Fermentationen mit konstantem pH-Wert liegt das Wachstum der Kulturen deutlich über dem maximalen Wachstum von Fermentationen mit unbeeinflußtem pH. Bei Fermentation X betrug das Myceltrockengewicht 34 g/l, dies ist fast das doppelte der bisherigen Fermentationen. Gleichzeitig ging die Nikkomycinproduktion, im Vergleich zu Fermenter VII und VIII, auf ein Drittel zurück. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Fermenter XI, das Myceltrockengewicht war mit 28 g/l immer noch weit über den bisherigen Ergebnissen und die Produktion lag unter den sonst erhaltenen Ausbeuten. Dies deutet auf eine negative Korrelation zwischen Wachstum und Nikkomycinproduktion hin, was auch schon bei anderen Sekundärmetaboliten nachgewiesen werden konnte (Kappner et al., 1978).

1.11. Steigerung der Hefeextraktkonzentration im Fermenter

Wie unter III.1.9.2. beschrieben, führen Konzentrationen von Hefeextrakt > 1 % zum Abfallen des pH-Wertes in den alkalischen Bereich bei gleichzeitiger Verringerung der Nikkomycinproduktion. Wenn man den pH-Wert im Fermenter konstant hält, läßt sich sowohl dieser negative Effekt einer höheren Hefeextraktkonzentration vermeiden, als auch die Produktion

unabhängig vom Verlauf des pH-Wertes verfolgen.

Fermenter XIII

Fermentationsbedingungen:
Medium: D
pH-stat.: 5,5 ± 0,1

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 25 g/l
Maximale Produktion: 1,9 g/l
Fermentationsdauer: 145 h

Diese Fermentation brachte das bisher beste Ergebnis hinsichtlich der Nikkomycinproduktion. Aus Abbildung 2 sind der Wachstumsverlauf und die Nikkomycinproduktion während der Fermentation ersichtlich.

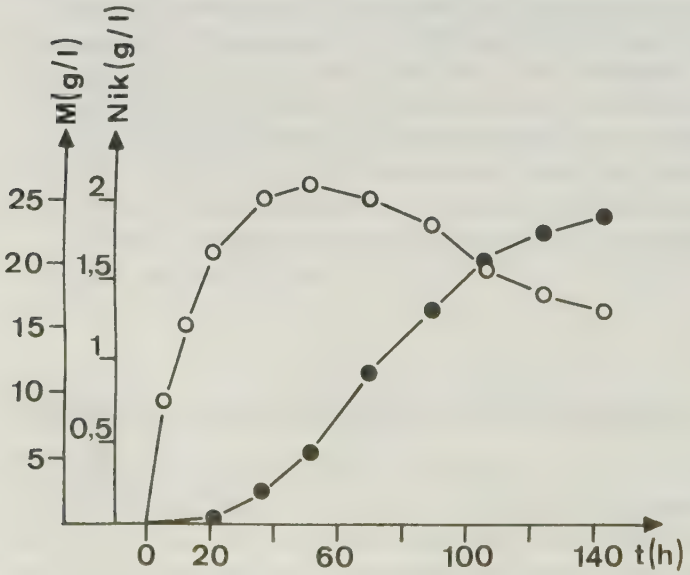


Abb. 2: Fermenter XIII, ●-● Nikkomycinbildung und o-o Wachstumsverlauf

In einer weiteren Fermentation wurde die Hefeextraktkonzentration nochmals gesteigert und die Wirkung auf die Nikkomycinproduktion verfolgt.

Fermenter XIV

Fermentationsbedingungen:
Medium: D, aber 3 % Hefeextrakt
pH-stat.: 5,5 ± 0,1

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 24 g/l
Maximale Produktion: 1,5 g/l
Fermentationsdauer: 140 h

Eine höhere Hefeextraktkonzentration führt also zu keiner weiteren Steigerung der Produktion.

1.12. pH-Regelung im Fermenter mit Schwefelsäure

In den vorherigen Fermentationen erfolgte die Regelung des pH-Wertes mit Phosphorsäure. Nur in den ersten 48 Stunden der Fermentation wird die Phosphorsäure zum Konstanthalten des pH-Wertes benötigt. In diese Zeit fällt auch das Hauptwachstum der Kultur. Da eine negative Korrelation zwischen Wachstum und Nikkomycinproduktion besteht, darf das Mycelwachstum nicht zu stark sein. Wie unter III.1.5. gezeigt, üben Phosphationen einen positiven Einfluß auf das Wachstum der Kultur und einen negativen Einfluß auf die Nikkomycinproduktion aus. Der Einfluß von Phosphat auf die Antibiotikaproduktion ist schon länger bekannt. Zusammenfassende Literatur findet man bei Martin (1977).

Die bisher verwendete Phosphorsäure wurde deshalb in den folgenden Versuchen durch Schwefelsäure ersetzt. Als Nährlösung diente Medium D. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Fermentationen zusammengestellt.

Tabelle 13: Ergebnisse der Fermentationen XV-XVII

Fermenter	pH-stat.	Wachstum (g/l)	Nik (g/l)	Fermentationsdauer (h)
XV	4,5	22	1,6	164
XVI	5,0	23	1,4	168
XVII	5,5	23	1,3	160

Wie das Ergebnis zeigt, bringt die Verwendung von Schwefelsäure an Stelle von Phosphorsäure keine Vorteile. Das Wachstum der Kultur war zwar geringfügig niedriger als bei der Verwendung von Phosphat, die Nikkomycinproduktion von Fermenter XIII wurde aber nicht erreicht. Die Melaninbildung des Produktionsstammes wurde bei Verwendung von Schwefelsäure in Verbindung mit dem pH-Wert von 4,5 weitgehend unterdrückt, so daß das Kulturfiltrat eine gelbe Färbung aufwies, im Gegensatz zur sonstigen stark braunen Färbung. Mit steigendem pH-Wert verstärkte sich auch die Melaninbildung wieder.

An Stelle von H_3PO_4 bzw. H_2SO_4 könnte auch Essigsäure zur pH-Steuerung verwendet werden. Hierbei muß man aber berücksichtigen, daß Acetat vom Produzentenstamm verwertet wird und damit ein Feeding einer Kohlenstoffquelle erfolgt.

1.13. Ersatz von Sojamehl durch Soytone und Sojaöl

Die Verwendung von Sojamehl bringt einige Nachteile mit sich. Zum einen ist das Medium nicht vollständig löslich, was eine genaue Stickstoffbestimmung nach der Micro-Kjeldahl-Methode fast unmöglich macht; zum anderen erhält das Medium während der Fermentation durch Melaninbildung des

Stammes eine so starke Eigenfärbung, daß eine exakte Stärkebestimmung nicht möglich ist. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde versucht, das Sojamehl durch Bacto-Soytone, einem wasserlöslichen Sojahydrolysat, und Sojaöl zu ersetzen.

1.13.1. Schüttelkolbenversuche

In Schüttelkolbenversuchen wurde zuerst das optimale Verhältnis von Sojaöl und Bacto-Soytone untersucht. Als Nährlösung diente Medium C ohne Sojamehl. Der pH-Wert und der Nikkomycingehalt aus 3 Parallelkolben am 4. und 6. Versuchstag sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Einfluß von Sojaöl und Soytone auf die Nikkomycinproduktion

Soytone	Sojaöl	4. Tag		6. Tag	
%	%	Nik. (g/l)	pH	Nik. (g/l)	pH
2,0	0,0	0,45	6,7	0,15	7,1
1,5	0,5	0,80	6,5	0,45	7,1
1,0	1,0	1,00	5,7	0,80	6,1
0,5	1,5	1,00	5,6	1,30	5,4
0,0	2,0	0,70	5,8	0,80	5,9
Kontrolle[a)]		1,70	5,8	2,10	6,0

[a)] Medium C

Am besten erwies sich ein Verhältnis von 0,5 % Soytone und 1,5 % Sojaöl. Ausgehend von diesen Konzentrationen wurde eine weitere Optimierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 angeführt.

Tabelle 16: Variation der Sojaöl- und Soytone-Konzentration

Soytone %	Sojaöl %	4. Tag Nik. (g/l)	4. Tag pH	6. Tag Nik. (g/l)	6. Tag pH
0,5	1,5	1,0	5,4	1,2	5,3
0,5	2,0	1,0	5,3	1,1	5,3
0,5	3,0	1,0	4,9	1,2	4,9
0,5	4,0	0,8	5,3	1,2	5,1
1,0	1,5	0,9	5,2	1,0	4,8
1,5	1,5	0,6	5,3	0,7	4,9
2,0	1,5	0,6	5,7	0,7	5,0
3,0	1,5	0,3	6,2	0,7	5,1
Kontrolle[a)]		1,5	5,6	2,1	5,3

[a)] Medium C

Eine weitere Steigerung dieser Komponenten führte zu keiner besseren Nikkomycinbildung. Hohe Anteile an Fettsäuren sind im Sojamehl enthalten. Nach Angaben von Young und Wood (1974) beträgt dieser ca. 19 %.

In einer weiteren Versuchtreihe wurde deshalb der Fettsäureanteil des Mediums C durch Zugabe von Sojaöl noch gesteigert. Die verschiedenen Sojaölkonzentrationen sowie die Ergebnisse am 4. und 6. Versuchstag aus 3 Parallelkolben zeigt Tabelle 17.

Eine Anreicherung des Mediums mit Sojaöl führte in fast allen Ansätzen zu schlechterer Produktion. Nur bei Verwendung von 1 % Sojaöl wurden die Ausbeuten des Kontrollansatzes erreicht.

Tabelle 17: Nikkomycinproduktion bei Anreicherung von Medium C mit Sojaöl

Sojaöl %	Sojamehl %	4. Tag Nik. (g/l)	4. Tag pH	6. Tag Nik. (g/l)	6. Tag pH
0,5	2,0	1,5	5,9	1,6	5,6
1,0	2,0	2,0	5,5	2,2	5,4
1,5	2,0	1,5	5,6	1,4	5,4
2,0	2,0	1,1	5,5	1,5	5,4
0,5	1,0	1,2	5,4	1,3	5,2
1,0	1,0	0,9	5,4	1,0	5,3
1,5	1,0	1,1	5,5	1,1	5,2
2,0	1,0	1,2	5,6	1,3	5,4
Kontrolle[a)]		1,8	5,8	2,1	5,4

a) Medium C

1.13.2. Fermentation

Mit dem in den vorhergehenden Versuchen ermittelten Medium wurde eine 20 l-Fermentation durchgeführt. Der Vorteil von Medium E besteht in der Möglichkeit einer sauberen Fermentationsanalyse.

Fermenter XVIII

Fermentationsbedingungen:
Medium: E
pH-stat.: 5,5 ± 0,1

Ergebnisse:
Maximales Wachstum: 17 g/l
Maximale Produktion: 1,3 g/l
Fermentationsdauer: 120 h

Die Darstellung des Wachstums und Nikkomycingehaltes erfolgt in Abbildung 3, die Bestimmung von Mannit, Stärke und Stickstoff in Abbildung 4.

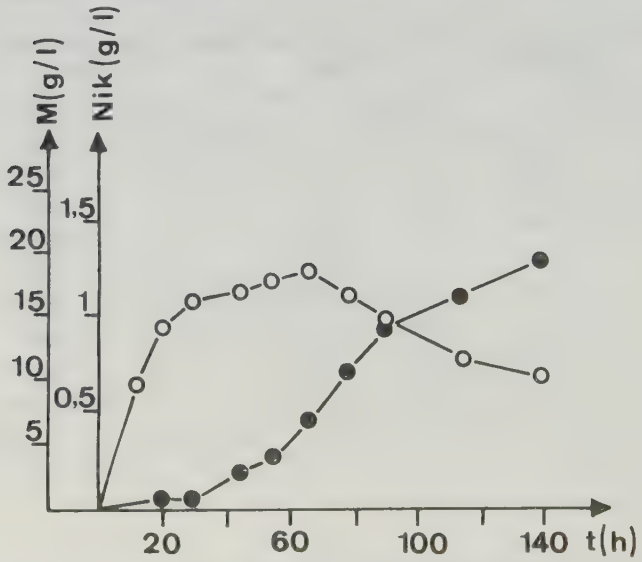


Abb. 3: o-o Wachstum und ●-● Nikkomycingehalt

Die Fermentation blieb in ihrer Produktion gegenüber Fermentationen mit 2 % Sojamehl um etwa 40 % zurück. Die Analyse zeigt, daß in den ersten 20 Stunden fast nur Stärke verwendet wird, während anschließend Mannit und Stärke gleichzeitig abgebaut werden; es liegt somit keine echte Diauxie vor. Mit Verbrauch der Stärke beginnt die Myceltrockengewichtskurve abzuknicken, und der Stamm beginnt teilweise zu lysieren. Der Stickstoff im Medium sinkt im Laufe der Fermentation ab, um nach ca. 80 Stunden, bedingt durch die Lyse des Produzentenstammes, wieder leicht anzusteigen.

Die bisher durchgeführten Versuche zeigen, daß die Nährstoffkonzentration am Anfang der Fermentation nicht ohne weiteres erhöht werden kann, da durch dieses Vorgehen in den meisten Fällen die Nikkomycinproduktion abnahm. Deshalb

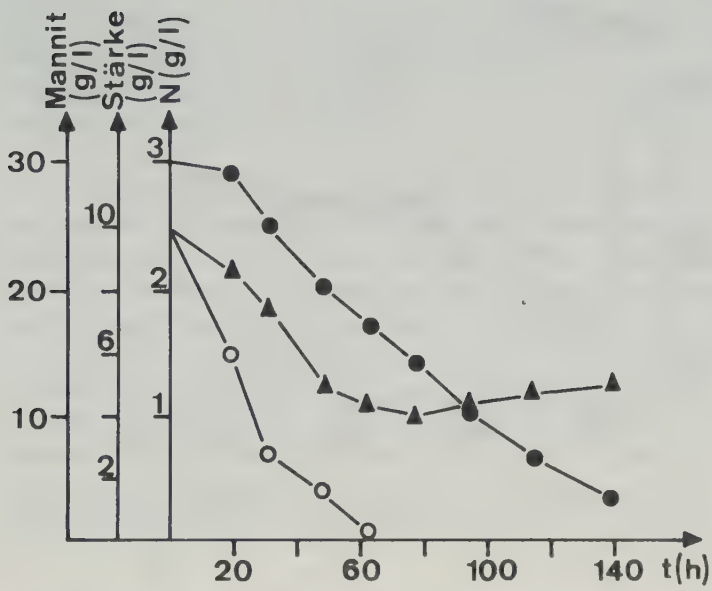


Abb. 4: Analyse von o-o Stärke, ●-● Mannit, ▲-▲ Stickstoff

ist es zur Erzielung einer höheren Nikkomycinausbeute nötig, während der Fermentation Nährstoffe zuzufüttern. Prinzipiell sind dafür 2 Möglichkeiten vorhanden:

1. Substratfeeding über Sauerstoffpartialdruck
2. Substratfeeding über pH-Steuerung

Da aber nur in den ersten 48 Stunden der Fermentation Säure zur Regelung des pH-Wertes benötigt wird, ist es nicht möglich, organische Säuren als Nährstoffquellen einzusetzen.

Wie die Sauerstoffpartialdruckkurve von Fermenter XIII (Abb. 5) zeigt, steigt der pO_2-Wert nach ca. 25 Stunden wieder an. Dieser Anstieg fällt zusammen mit der Umstellung vom alleinigen Stärkeabbau auf den gleichzeitigen Abbau von Mannit und Stärke. Der Anstieg nach 60 Stunden korrespondiert mit dem Verbrauch der Stärke in der Nährlösung. Zu diesem Zeitpunkt kann durch Einstellen eines Sauerstoffmaximalwertes am pO_2-Regler weitere Nährlösung zugefüttert werden.

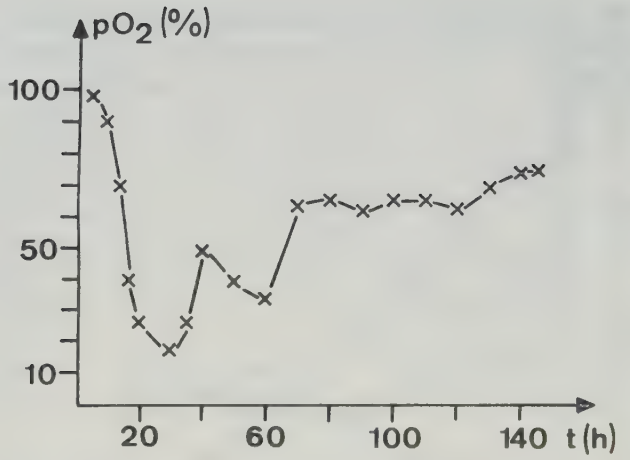


Abb. 5: Sauerstoffpartialdruck im Medium der Fermentation XIII

Das Feeding von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen über den pO_2-Wert wurde in der folgenden Fermentation durchgeführt.

1.14. Substratfeeding über Sauerstoffpartialdruck

Fermenter XIX

Fermentationsbedingungen:
Medium: D
pH-stat.: 5,5 ± 0,1

Feedinglösung:	300 g Mannit	gelöst in H_2O
	200 g Sojaöl	Gesamtvolumen 2 l
	100 g Hefeextrakt	

pO_2-Maximalwert: 30 %, eingestellt nach 65 h.

Ergebnisse:

Maximales Wachstum: 24 g/l
Maximale Produktion: 1,9 g/l
Fermentationsdauer: 180 h

Die Fermentation brachte nicht das erwartete Ergebnis, da die Produktion gegenüber Fermenter XIII nicht gesteigert werden konnte. Das Zufüttern von Nährlösung verhinderte die Lyse des Produzentenstammes und pendelte das Myceltrockengewicht auf einen konstanten Wert von 21 g/l ein; in Fermentationen ohne Feeding nahm die Myceltrockengewichtskurve nach Erreichen eines Maximalwertes ständig ab (vgl. Abb. 3). In Abbildung 6 sind Myceltrockengewicht, Nikkomycingehalt und Zugabe der Feedinglösung/Zeiteinheit abgebildet. Um die Produktion zu steigern, sind noch weitere Untersuchungen in dieser Richtung notwendig.

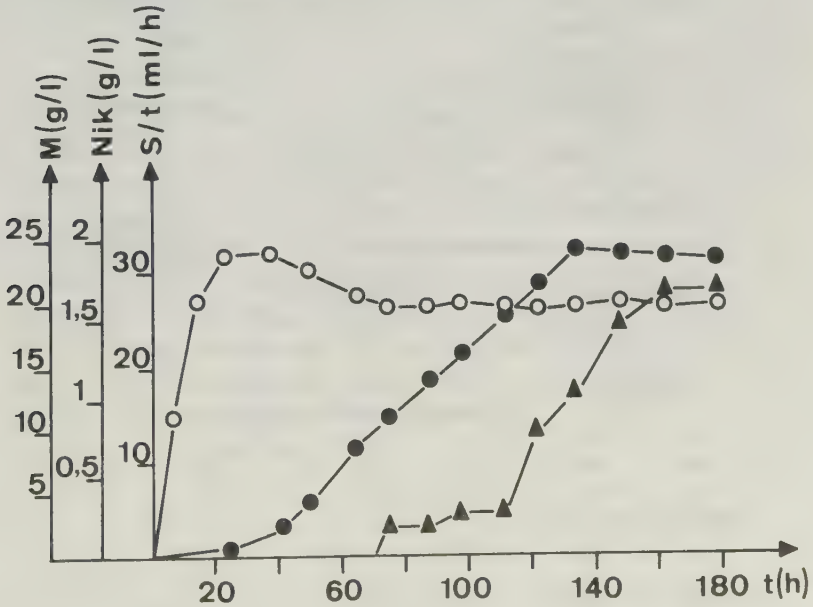


Abb. 6: Analyse von Fermenter XIX
o-o Myceltrockengewicht, ●-● Nikkomycingehalt,
▲-▲ Substratzugabe/Zeiteinheit

2. Isolierung und Charakterisierung

In Abbildung 7 ist das Verfahren zur Herstellung von Reinsubstanzen aus Kulturen von Streptomyces tendae dargestellt.

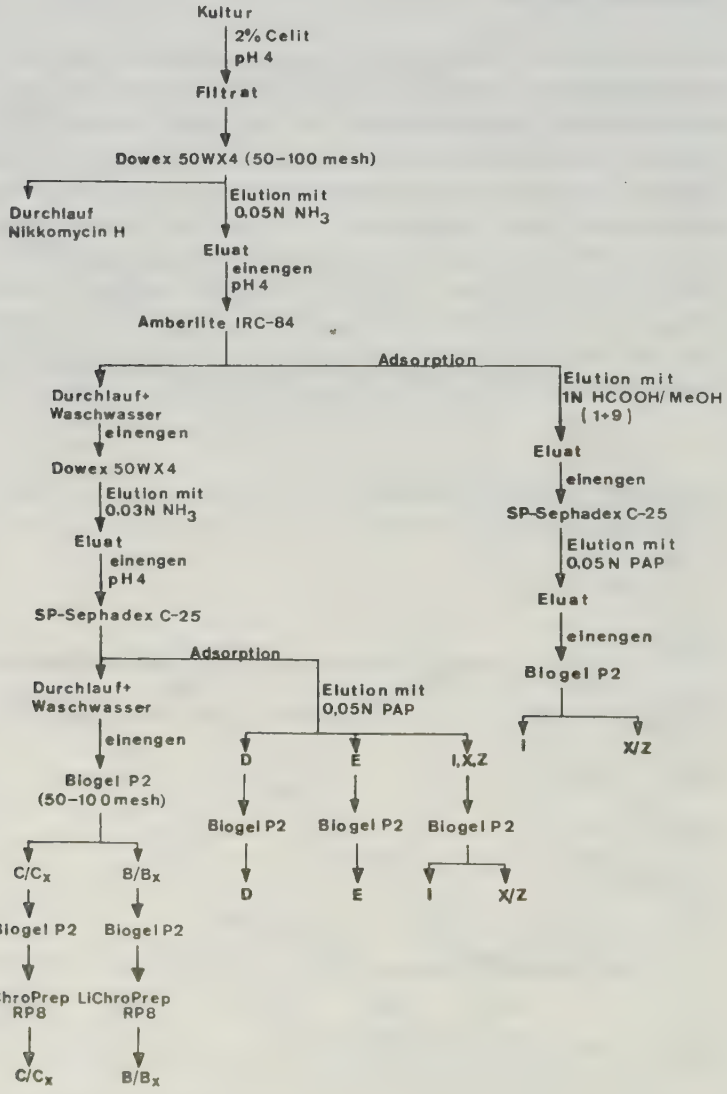


Abb. 7: Reinigungsverfahren der Nikkomycine aus TÜ 901

Ausgangspunkt für das vorliegende Isolierungsverfahren war das Aufarbeitungsschema, wie es bei Dähn et al. (1976) beschrieben ist.

2.1. Isolierung der Nikkomycine I, Z/X

2.1.1. 1. Reinigungsschritt

Als erster Aufarbeitungsschritt wurde eine Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50WX4 (Na^+-Form, 50-100 mesh) durchgeführt. An diesem Material werden etwa 97 % der Aktivität gebunden, während sich die restlichen 3 % im Durchlauf und Waschwasser wiederfinden. In den Abbildungen 8 und 9 sind HPLC-Diagramme von Kulturfiltrat und dem Durchlauf der Dowex-Säule dargestellt.

Peak 5 aus Abbildung 8 taucht zusammen mit Peak 1 und 2 im Durchlauf der Dowex-Säule auf (Abb. 9). Nikkomycin H wurde bisher nicht weiter verfolgt, da einmal die Aktivität im Plattendiffusionstest gegen Mucor hiemalis (±) im Durchlauf der Dowex-Säule sehr gering war und zum anderen erst durch die Entwicklung der HPLC-Trennmethode das Vorhandensein dieser Substanz erkannt wurde. Der Hauptteil des gebildeten Nikkomycin C/C_x scheint ebenfalls im Durchlauf der Dowex-Säule aufzutreten, so daß das in der weiteren Aufarbeitung isolierte Nikkomycin C/C_x nur einen kleinen Teil der insgesamt produzierten Substanz darstellt.

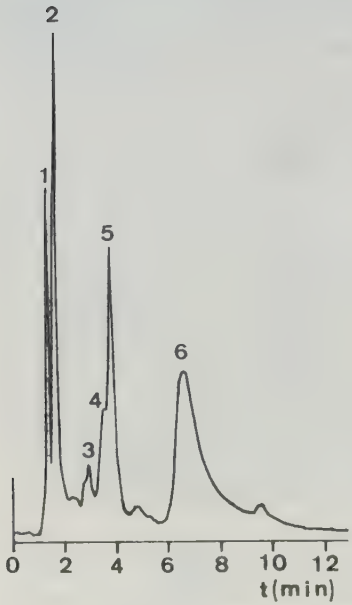


Abb. 8:

Auftrennung der Nikkomycine aus dem Kulturfiltrat mit Hilfe der HPLC

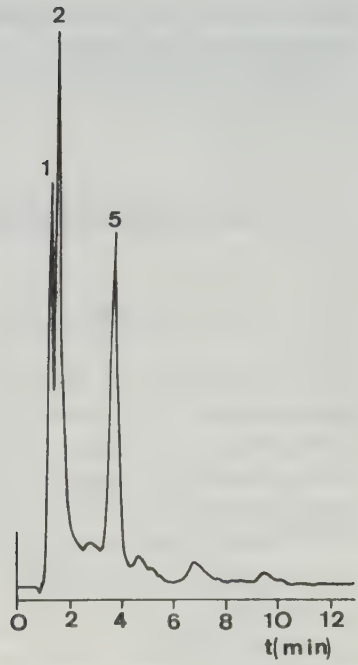


Abb. 9:

Auftrennung der Nikkomycine aus dem Durchlauf der Dowex Säule mit Hilfe der HPLC

Legende für Abbildungen 8 und 9:
Peak 1: gelber Farbstoff (siehe 2.1.3.)
Peak 2: Nikkomycin C/C_x
Peak 3: Nikkomycin D
Peak 4: Nikkomycin I
Peak 5: Nikkomycin H
Peak 6: Nikkomycin Z/X

2.1.2. 2. Reinigungsschritt

Als zweiter Ionenaustauscher wurde von Dähn et al. (1976) Amberlite 252, ein stark saurer Kationenaustauscher, verwendet. Unbefriedigend an diesem Schritt waren jedoch die hohen Substanzverluste und der geringe Reinigungseffekt.

Bei nachfolgendem Auftragen auf die SP-Sephadex C-25 Säule, einem stark sauren Gel-Kationenaustauscher, kann, bedingt durch den geringen Reinheitsgrad, ein starkes Verschmieren der Substanz auf der Säule auftreten. Die biologische Aktivität kann nicht mehr in einer scharfen Bande eluiert werden und die Verluste sind damit relativ hoch.

Der Ersatz des Amberlite 252-Ionenaustauschers durch Amberlite IR-120, einem ebenfalls stark sauren Kationenaustauscher, führte zu keinem Erfolg.

Wesentlich bessere Ergebnisse wurden mit Amberlite IRC-84, einem schwach sauren Kationenaustauscher, erzielt. Im folgenden wurde untersucht, unter welchen Bedingungen und mit welchem Verlust die Aktivität eluiert werden kann.

Tabelle 18: Elution der biologischen Aktivität von IRC-84

Elutionsmittel	Aktivität Durchlauf %	Aktivität Waschwasser %	Aktivität % Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III	Verlust an biolog. Aktivität %
0,001 N HCOOH	7	3	4	3	3	90
0,01 N HCOOH	7	3	3	10	15	72
0,01 N HCOOH/ MeOH(1+1)	8	3	15	17	17	51
0,1 N HCOOH/ MeOH(1+9)	9	3	25	20	20	35
1 N HCOOH/ MeOH(1+9)	8	4	28	33	24	15

Das IRC-84 Material bietet 2 Vorteile, zum einen kann die Aktivität mit relativ geringen Verlusten eluiert werden, zum anderen zeigt das resultierende Produkt eine deutlich verringerte Verunreinigung als das Ausgangsprodukt. Der Nachteil besteht darin, daß man relativ große Elutionsvolumen benötigt.

Die Aufarbeitung und Charakterisierung der Aktivität im Durchlauf und Waschwasser der IRC-84 Säule wird unter III.2.2. beschrieben.

2.1.3. 3. und 4. Reinigungsschritt

Der 3. und 4. Reinigungsschritt wurden unverändert übernommen (SP-Sephadex C-25, Biogel P2).

Bei der Chromatographie des von der SP-Sephadex C-25 Säule erhaltenen Produktes an Biogel P2 ergab sich folgendes Elutionsdiagramm, das in Abbildung 10 dargestellt ist.

Bei Peak 1 handelt es sich um den gelben Farbstoff (siehe 2.1.1.), bei Peak 2 handelt es sich um Nikkomycin I, und Peak 5 enthält die natürlich anfallende Mischung aus Nikkomycin Z und X. Nikkomycin Z ist identisch mit dem bei Dähn et al. (1976) beschriebenen Nikkomycin. Die Strukturaufklärung von Nikkomycin X ist bei Hagenmaier et al. (1979) dargestellt.

Das anfallende Nikkomycin Z/X-Gemisch bestand, bestimmt nach der Dimedon-Reaktion, aus 90 % Nikkomycin X und 10 % Nikkomycin Z. Die Ausbeute aus einem 20 l-Fermenter betrug 25 % der im Kulturfiltrat vorhandenen Menge, so daß bei einer Produktion von 1,3 g/l ca. 5 g sauberes Nikkomycin Z/X-Gemisch isoliert werden konnte.

Sauberes Nikkomycin I ließ sich mit einer Ausbeute von etwa 0,8 g isolieren.

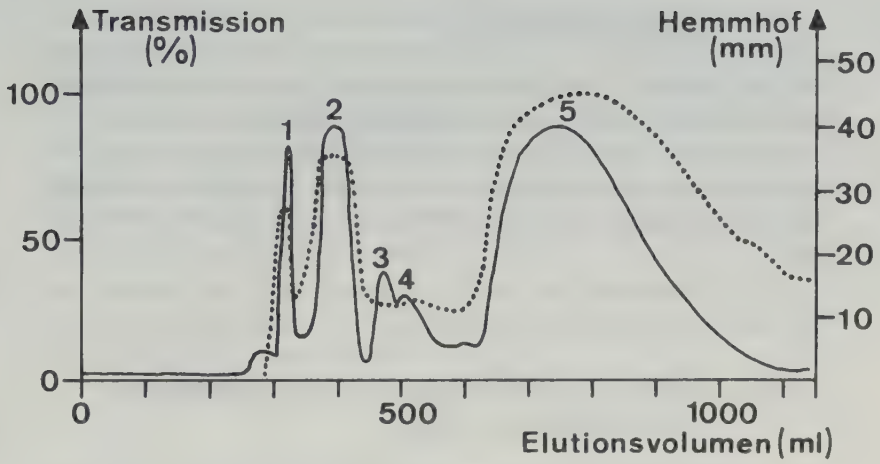


Abb. 10: Elutionsdiagramm der Biogel P2-Säule
—— UV-Absorption bei 280 nm
... Aktivität gegen Mucor hiemalis (±)
Peak 1: gelber Farbstoff; Peak 2: Nikkomycin I
Peak 3: Nucleosidteil von Nikkomycin Z/X;
Peak 4: Amminosäureteil von Nikkomycin Z/X;
Peak 5: Nikkomycin Z/X

2.2. Isolierung der Nikkomycine C/C_X, B/B_X, D, E, I, Z/X

Im Durchlauf und Waschwasser der IRC-84 Säule befanden sich immer etwa 10 % der auf die Säule aufgetragenen Aktivität. Dies ließ sich auch nicht durch pH-Änderungen des Auftragmaterials vermeiden. Auf Grund dieses Verhaltens bestand der Verdacht, daß im Durchlauf und Waschwasser der IRC-84 Säule Nikkomycin-analoge Substanzen enthalten sein könnten. Im folgenden wurde versucht, durch geeignete Reinigungsschritte die Isolierung dieser Substanzen zu ermöglichen.

2.2.1. 1. Reinigungsschritt

Mit dem Durchlauf und Waschwasser der IRC-84 Säule erfolgte eine nochmalige Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50WX4 (50-100 mesh). Dieser Schritt hat 2 Vorteile: Einmal werden Verunreinigungen abgetrennt und zum anderen erreicht man eine Konzentrierung des Flüssigkeitsvolumens um Faktor 10.

2.2.2. Trennung der Nikkomycine C/C_x und B/B_x von den Nikkomycinen D, E, I, Z/X

Als zweiter Schritt erfolgte eine Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-25. Dabei zeigte sich, daß ein Teil der Aktivität des Auftragmaterials gebunden wurde, während der andere Teil im Durchlauf und im Waschwasser zu finden war. Abbildung 11 zeigt die UV-Absorption und den Aktivitätsverlauf im Plattendiffusionstest vom Durchlauf und Waschwasser der SP-Sephadex C-25 Säule.

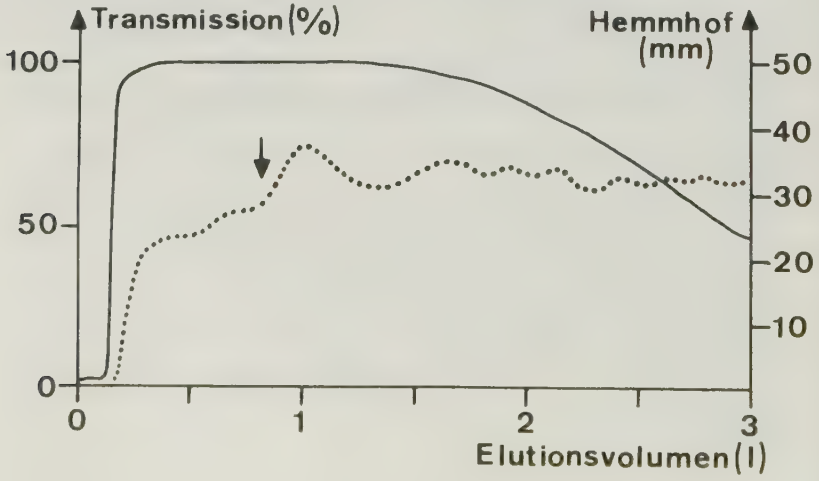


Abb. 11: —— UV-Absorption bei 280 nm und ... Aktivität gegen Mucor hiemalis (±) im Durchlauf und Waschwasser der SP-Sephadex C-25 Säule
↓ Beginn der B/B_x-Aktivität

Eine dünnschichtchromatographische Überprüfung mit anschließender Bioautographie zeigte, daß eine Substanz angereichert wurde, die sich im Rf-Wert deutlich von Nikkomycin Z/X unterschied und als Nikkomycin B/B_x bezeichnet wurde. Der Beginn der B/B_x-Aktivität ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. Durch Besprühen mit Ninhydrin konnte zudem festgestellt werden, daß auch Nikkomycin C/C_x im SP-Sephadex C-25 Durchlauf enthalten ist.

Am SP-Sephadex C-25 Material werden die Nikkomycine D, E, I und X/Z gebunden. Die Aufarbeitung dieser Substanzen ist unter II.2.2.4. beschrieben.

2.2.3. Trennung und Reinigung von C/C_x und B/B_x

Versuche, eine weitere Reinigung über Aktivkohle zu erhalten, führten zu keinem großen Erfolg. Es wurde zwar die gesamte Aktivität gebunden, aber sowohl mit Aceton/1 N HCOOH (1+9) und Aceton/H_2O (1+9) als Desorptionssystem gelang keine quantitative Elution. Zudem erwies sich der Reinigungseffekt als unbefriedigend.

In einem weiteren Versuch wurde deshalb untersucht, ob sich die Substanzen mit Hilfe der Gelchromatographie trennen lassen. Da das Produkt aber noch sehr verunreinigt und noch relativ große Volumen vorhanden waren, wurde ein sehr grobkörniges Biogel P2-Material (50-100 mesh) verwendet. In Abbildung 12 ist das Elutionsdiagramm der Biogel P2-Säule dargestellt.

Bei Peak 1 handelt es sich um Nikkomycin C/C_x, Peak 2 verhält sich dünnschichtchromatographisch wie Nikkomycin Z/X und wurde deshalb nicht näher untersucht, da die Vermutung nahe liegt, daß es sich hier um geringe Mengen von Nikkomycin Z/X handelt; Peak 3 stellt Nikkomycin B/B_x dar.

Die Trennleistung der Säule ist hinreichend gut, während der Reinigungseffekt, besonders für Nikkomycin C/C_x, sehr schlecht ist.

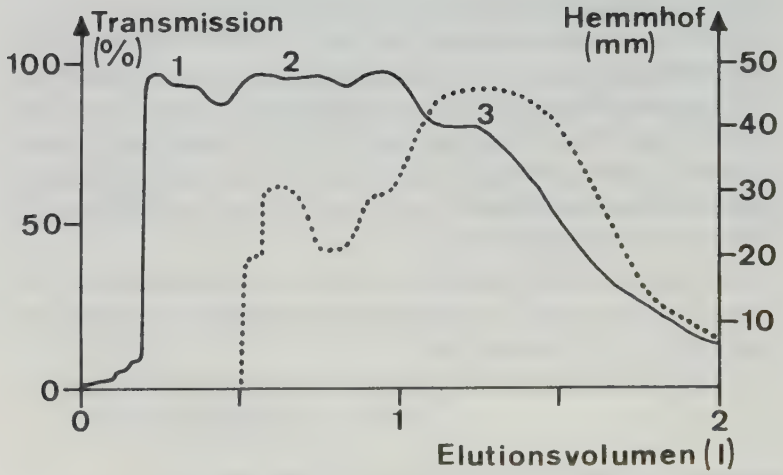


Abb. 12: Elutionsdiagramm von Biogel P2
—— UV-Absorption bei 280 nm
... Aktivität gegen Mucor hiemalis (±)
Peak 1: Nikkomycin C/C_x; Peak 2: vermutlich Nikkomycin Z/X; Peak 3: Nikkomycin B/B_x

Die weitere Reinigung erfolgte dann an Biogel P2 (100-200 mesh). Man erhält nach Lyophilisation ein goldgelb gefärbtes Produkt, welches auch durch weitere Chromatographie an Biogel P2 (200-400 mesh, Säulenlänge 2 m) nicht sauberer wird. Erst die Verwendung der Reversed-phase-Chromatographie (Snyder und Kirkland, 1974) brachte gute Ergebnisse. Als Säulenmaterial diente LiChroPrep RP 8 (Korngröße 20-40 µ) und als Fließmittel entionisiertes Wasser. Durch diese Methode werden sämtliche lipophile Verunreinigungen gebunden und die Substanz wird mit der Lösungsmittelfront eluiert. Die Ausbeute (20 l-Fermenter) an Nikkomycin C/C_x-Gemisch betrug 350 mg. Das Gemisch setzt sich aus 10 % Nikkomycin C und 90 % Nikkomycin C_x zusammen.

An Nikkomycin B/B_x ließen sich 120 mg isolieren. Im Nikkomycin B/B_x-Gemisch ist die Komponente Nikkomycin B nur in Spuren vorhanden (König 1977).

2.2.4. Trennung und Reinigung von D, E, I und Z/X

Die SP-Sephadex C-25 Säule (III.2.2.2.) wurde diskontinuierlich mit Pyridin-Acetat-Puffer verschiedener Normalität eluiert. Wie aus der Abbildung 13 ersichtlich ist, wurde bereits mit 0,01 N PAP eine UV-absorbierende und Mucor-Aktivität zeigende Substanz eluiert.

Eine nachfolgende Überprüfung der ursprünglich als Nikkomycin G bezeichneten Substanz mit Hilfe der HPLC bewies aber leider die Identität mit Nikkomycin B/B_x.

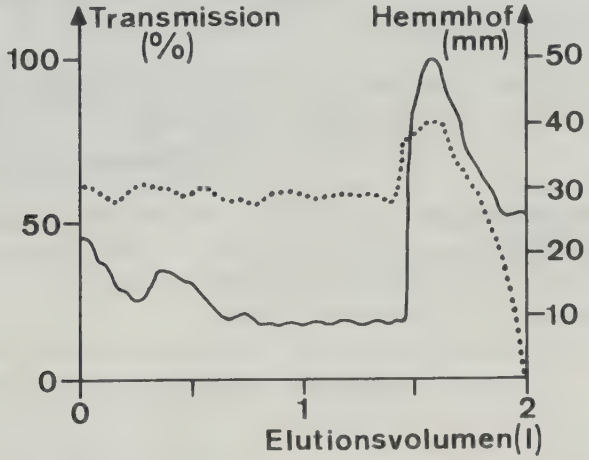


Abb. 13: Elutionsdiagramm der SP-Sephadex C-25 Säule mit 0,01 N PAP
—— UV-Absorption bei 280 nm
... Aktivität gegen Mucor hiemalis (±)

Mit 0,03 N PAP wurden von der SP-Sephadex C-25 Säule nacheinander die Nikkomycine D, E, I und Z/X eluiert. In Abbildung 14 ist das Elutionsdiagramm mit 0,03 N PAP dargestellt. Peak 1 enthält Nikkomycin D, bei Peak 2 handelt es sich um Nikkomycin E und Peak 3 ist eine Mischung aus Nikkomycin I und Z/X. Die weitere Reinigung von Nikkomycin D und E erfolgte dann mit Hilfe der Gelchromatographie an

Biogel P2 (100-200 mesh). Die Ausbeute an Nikkomycin D betrug 180 mg, an Nikkomycin E 130 mg.

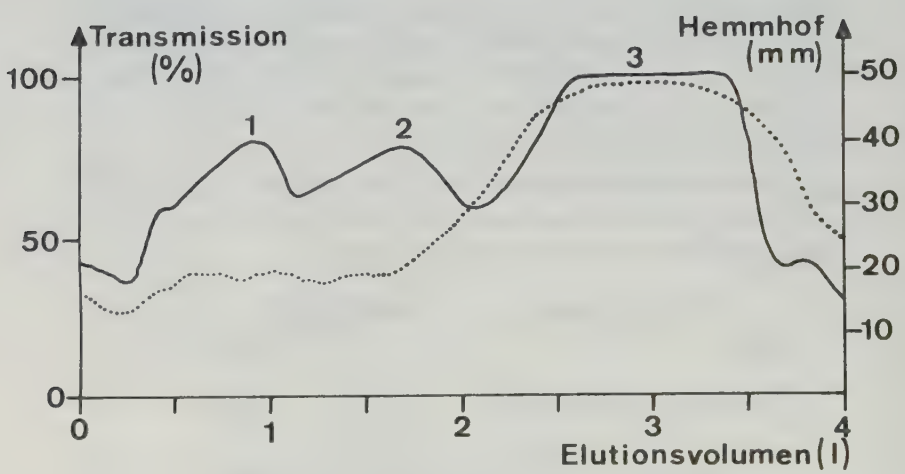


Abb. 14: Elutionsdiagramm der SP-Sephadex C-25 Säule mit 0,03 N PAP
—— UV-Absorption bei 280 nm
... Aktivität gegen Mucor hiemalis (±)

Mengenmäßig ergeben die auf diesem Weg isolierten Nikkomycine I und Z/X etwa ein Zehntel der unter III.2.1.3. isolierten Ausbeute. Bisher ist es nicht gelungen, durch Variation der Bedingungen der IRC-84 Säule sämtliches Nikkomycin I und Nikkomycin Z/X am Ionenaustauschmaterial zu binden.

2.3. Aufarbeitung mit Amberlite IRC-50

Nach mehrmaliger Wiederholung der Aufarbeitung mit gleichem Ergebnis ergab sich bei weiteren Aufarbeitungen, daß es nicht mehr möglich war, Nikkomycin B/B_x in gleichen Ausbeuten zu erhalten. Da in diesen Versuchen neu erhaltenes IRC-84 Material eingesetzt worden war, wurde vermutet, daß der

Grund der geringen Ausbeute vielleicht hierin zu suchen sei. Deshalb wurde der Ionenaustauscher Amberlite IRC-84 durch Amberlite IRC-50, einem ebenfalls schwachsauren Kationenaustauscher, ersetzt.

Bei Verwendung von IRC-50 traten folgende Veränderungen auf:

1. Im Durchlauf und Waschwasser von IRC-50 waren etwa 15 % der Aktivität enthalten (bei IRC-84 dagegen nur 10 %).
2. IRC-50 konnte mit einem H_2O/MeOH (1+9)-Gemisch eluiert werden, wobei sich das Elutionsvolumen gegenüber IRC-84 auf die Hälfte verringerte.
3. Die Isolierung von Nikkomycin E war nicht mehr möglich.

Aufarbeitungen mit IRC-50 zeigten aber, daß sich auch mit diesem Ionenaustauscher die vorher erhaltenen Ausbeuten an Nikkomycin B/B_x nicht mehr erzielen ließen. Es konnten maximal noch 10 % der ursprünglichen Ausbeute isoliert werden. In Abbildung 15 ist das Elutionsdiagramm des Durchlaufs und Waschwassers der SP-Sephadex C-25 Säule dargestellt. Die beiden Pfeile geben den Bereich der Nikkomycin B/B_x-Aktivität wieder. Der Vergleich mit Abbildung 11 zeigt, daß Nikkomycin B/B_x nur in geringen Mengen vorhanden ist.

Da der Ionenaustauscher nicht verantwortlich für die geringe Nikkomycin B/B_x-Ausbeute war, wurden noch folgende Möglichkeiten untersucht:

1. verschiedene Fermenter (10 l-Fermenter mit Blattrührer, b 20 mit 20 l Inhalt, b 20 mit 25 l Inhalt)
2. verschiedene Nährmedien
3. verschiedene Einzelkolonien

Es zeigte sich aber bei sämtlichen Aufarbeitungen, daß die Nikkomycin B/B_x-Produktion nicht mehr die ursprüngliche Höhe erreichte und aus 20 l-Fermentern nur noch 10 mg isoliert werden konnten.

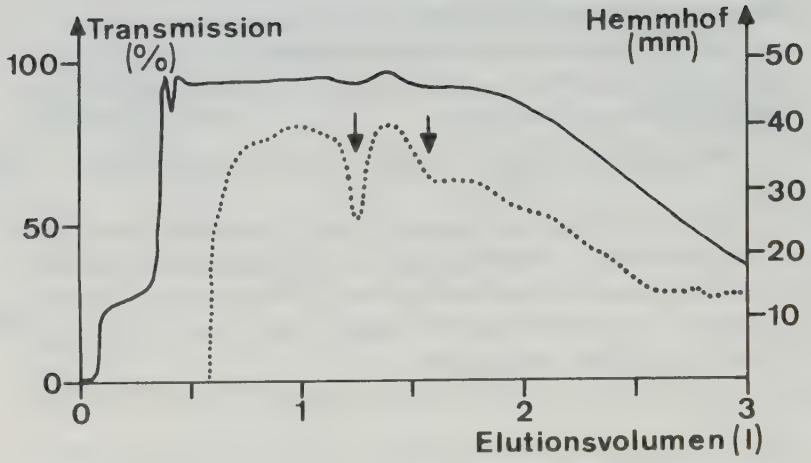


Abb. 15: Elutionsdiagramm des Durchlaufs und Waschwassers der SP-Sephadex C-25 Säule
—— UV-Absorption bei 280 nm, ... Aktivität gegen Mucor hiemalis (±), ↓ ↓ Bereich der Nikkomycin B/B_x-Aktivität

2.4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie[1)]

Es ist von Interesse, das Spektrum der Nikkomycine quantitativ bestimmen zu können (Fiedler, Dehler, 1979). Der Plattendiffusionstest mit Mucor hiemalis (±) zeigt mehrere Nachteile:

1. Eine Bestimmung der einzelnen Komponenten ist nicht möglich.
2. Nur die Gesamtaktivität der biologisch aktiven Substanzen ist bestimmbar.
3. Die Testplatten mit Mucor hiemalis (±) können erst nach 2 Tagen ausgewertet werden.

---

1) siehe II.10.6.

In Tabelle 19 sind die Massenverteilungsverhältnisse k' der Nikkomycine bei 290 nm angegeben.

Tabelle 19: Angabe der Massenverteilungsverhältnisse k' für die Nikkomycine

Nikkomycin	k'-Werte
Z/X	6,11
B/B_x	4,41
C/C_x	0,54
D	1,70
I	2,52
H	2,80

Unter den angewendeten Bedingungen war es nicht möglich, die Nikkomycine Z/X, B/B_x und C/C_x zu trennen.

Fermentationskulturen von Streptomyces tendae wurden auf die Produktion der einzelnen Nikkomycinkomponenten untersucht. Die Nikkomycine C/C_x, D, I und Z/X konnten quantitativ bestimmt werden. Nikkomycin B/B_x konnte wegen der geringen Produktion im Fermenter nicht nachgewiesen werden. Nikkomycin H kann nicht quantitativ bestimmt werden, da keine Vergleichssubstanz vorhanden ist. An Hand der Flächengröße der Peaks läßt sich aber der Verlauf der Nikkomycin H-Produktion verfolgen.

In Abbildung 16 ist die quantitative Bestimmung der Nikkomycine während der Fermentation XV dargestellt.

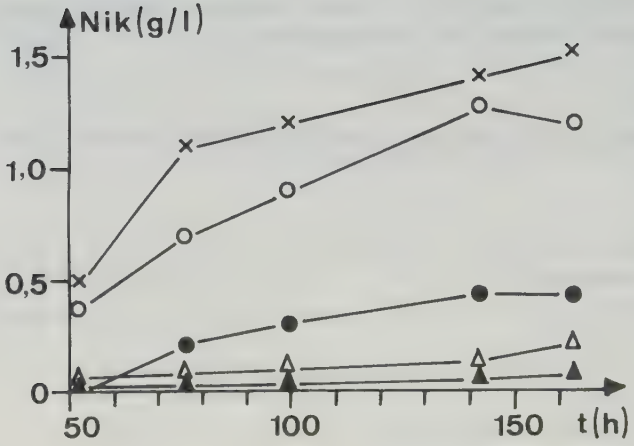


Abb. 16: Quantitative Bestimmung der Nikkomycine während des Fermentationsprozesses
x-x Aktivität gegen Mucor hiemalis (±), o-o Nikkomycin Z/X, ●-● Nikkomycin I, ▲-▲ Nikkomycin D, Δ-Δ Nikkomycin C/C_x

2.5. Versuche zur Trennung von Nikkomycin X und Z

2.5.1. Uridin-Nucleosidase

Mit den bisher benutzten chromatographischen Methoden war es nicht möglich, das natürlich anfallende Gemisch der Nikkomycine Z und X zu trennen. Deshalb wurde versucht, durch spezifische Zerstörung einer Komponente, die andere rein zu isolieren. Barman (1969) bringt eine Zusammenstellung mehrerer Organismen, die eine Uridin-Nucleosidase besitzen. Die hochspezifische Uridin-Nucleosidase aus Hefe ist ohne Wirkung auf Adenosin, Guanosin, Inosin, Cytidin und Thymidin (Carter, 1951). Der Ausgangspunkt der Überlegung war, daß eine Uridin-Nucleosidase möglicherweise Nikkomycin Z

spaltet und Nikkomycin X vollständig erhalten bleibt. Das Ergebnis dieses Versuches zeigen die Abbildungen 17 und 18.

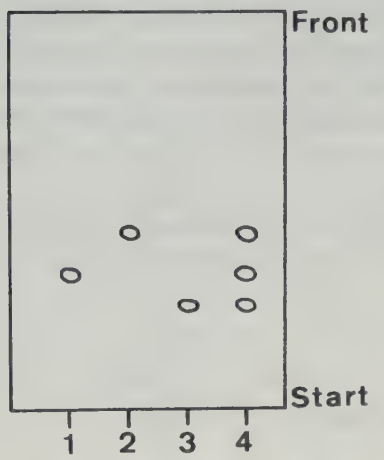


Abb. 17:

Papierchromatographie von Uridin (1), Uracil (2), Ribose (3) und Uridin nach Nucleosidasebehandlung (4)

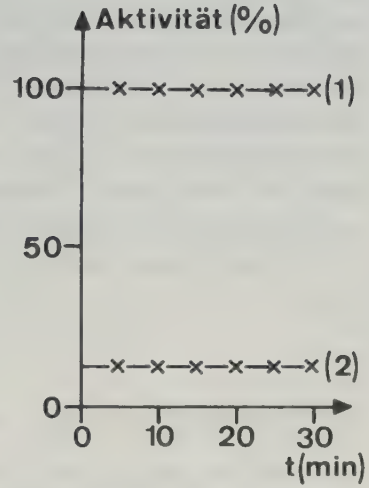


Abb. 18:

Aktivitätsverhalten von Nikkomycin Z/X nach Nucleosidasebehandlung. (1) Gesamtaktivität Nikkomycin Z/X, (2) Aktivität nach Dimedonbehandlung

Der Versuch beweist, daß das Enzym in der Lage ist, Uridin zu spalten. Es zeigte jedoch keinerlei Wirkung auf Nikkomycin Z. Bei einer Spaltung von Nikkomycin Z durch die Uridinnucleosidase hätte die Gesamtaktivität abnehmen und die Aktivität nach Dimedonbehandlung auf 0 % zurückgehen müssen.

2.5.2. Dowex 50WX4 (200-400 mesh)

Anderson et al. (1962) berichten von der Trennung von fünf Basen, fünf Nucleosiden und acht Nukleotiden an einer Dowex-Säule mit Gradienten-Elution. Für diese Methode werden fei-

ne Harzpartikel benötigt.
Für den Versuch zur chromatographischen Trennung von Nikkomycin Z/X wird Dowex 50WX 4 (200-400 mesh) verwendet und mit einem Gradienten von 0,01 N NH_3 zu 0,05 N NH_3 eluiert. Es gelang mit dieser Methode nicht, eine Trennung der beiden Substanzen zu erreichen. Bessere Ergebnisse lassen sich vielleicht mit einer Gradienten-Elution mit Ammoniumformiat (pH 4,0) erreichen, wie sie Crampton et al. (1960) zur Trennung von Basen verwendet haben.

Eine Trennung von Nikkomycin Z/X gelang Hagenmaier et al. (1979) durch analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

2.6. Strukturformeln der Nikkomycine

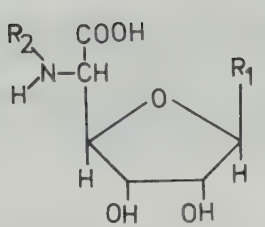
Es gelang Professor König, die Struktur eines Teils der hier dargestellten Nikkomycine aufzuklären. Seine Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengestellt. Für die Untersuchungen zur Strukturaufklärung möchte ich mich nochmals bei Prof. Dr. W.A. König bedanken. Mein Dank gilt auch Prof. Hagenmaier und Frl. Keckeisen für die Hilfe bei der Trennung und Charakterisierung von Nikkomycin X und Z.

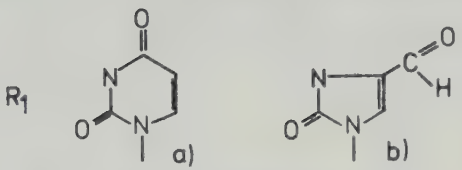
2.7. Physikalisch-chemische Charakterisierung

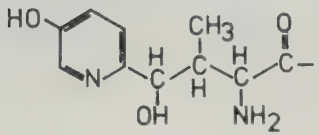
2.7.1. Dünnschichtchromatographie

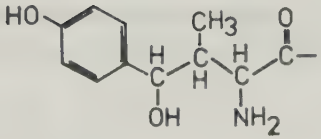
Das dünnschichtchromatographische Verhalten der Nikkomycine ist in Tabelle 21 dargestellt.

Bei Fließmittelsystemen, die Eisessig enthalten, tritt während der Chromatographie eine partielle Spaltung der Substanzen in Nucleosid und Aminosäure auf, weshalb nach Besprühen mit Ninhydrin 3 positive Flecken (Rf_1, Rf_2, Rf_3) zu erkennen sind. Nur die Flecken bei Rf_2 zeigen das intakte Molekül.

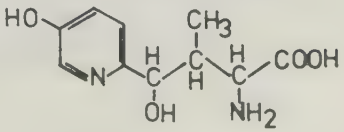




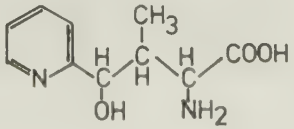




Nikkomycin C :	R_1 = a	R_2 = e
Nikkomycin C_x:	R_1 = b	R_2 = e
Nikkomycin B :	R_1 = a	R_2 = d
Nikkomycin B_x:	R_1 = b	R_2 = d
Nikkomycin Z :	R_1 = a	R_2 = c
Nikkomycin X :	R_1 = b	R_2 = c
Nikkomycin I :	Struktur unbekannt	
Nikkomycin H:	Struktur unbekannt	



Nikkomycin D



Nikkomycin E

Tabelle 20: Strukturformeln der Nikkomycine

Tabelle 21: Dünnschichtchromatographie der Nikkomycine
a) Laufmittel: Butanol-Pyridin-H_2O (1:1:1) Kieselgel
b) Laufmittel: Propanol-H_2O (8:2) Cellulose
c) Laufmittel: Äthanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) Cellulose

Nikkomycine	Rf-Werte				
	a	b	c		
			Rf_1	Rf_2	Rf_3
B/B_x	0,86	0,38	0,22	0,58	0,72
C/C_x	0,78	0,13		0,22	
D	0,82	0,51		0,67	
E	0,83	0,56		0,66	
I	0,85	0,25	0,22	0,30	0,62
Z/X	0,84	0,27	0,22	0,32	0,67

2.7.2. Papierelektrophorese

Das Verhalten der Nikkomycine bei der Papierelektrophorese in Abhängigkeit von den pH-Werten der Puffersysteme zeigt Tabelle 22.

Tabelle 22: Elektrophoretisches Verhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert
a) Pyridin-Acetat-Puffer pH 3,9
b) Pyridin-Acetat-Puffer pH 6,1
c) Borat-HCl-Puffer pH 8,6

Nikkomycine	Laufstrecke (mm)		
	a	b	c
B/B_x	-3	0	+10
C/C_x	+2	-2	+11
D	-4	-6	+12
E	-6	-4	+ 5
I	-4	0	+17
Z/X	-6	0	+ 2

2.7.3. Stabilitätsverhalten

Das Stabilitätsverhalten wurde nur an der Hauptkomponente Z/X untersucht. In den Tabellen 23 und 24 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefaßt.

Tabelle 23: Stabilität von Nikkomycin Z/X in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Restaktivität in % nach 7 Tagen	
	4°C	22°C
H_2O dest.	90	65
Leitungswasser	80	35
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0	90	30
1 % Essigsäure	90	90

Überraschend an diesem Ergebnis ist die gute Stabilität von Nikkomycin Z/X in Essigsäure.

Tabelle 24: Stabilität von Nikkomycin Z/X in Elutionsmitteln der Säulen

Lösungsmittel	Restaktivität in % nach 7 Tagen	
	4°C	22°C
Medium C pH 7,5	80	45
0,05 N NH_3 pH 9,8	75	7
1 N HCOOH/MeOH (1+9) pH 2,8	100	80
H_2O/MeOH (1+9) pH 7,0	90	80
0,05 N PAP pH 4,7	100	80
0,5 M Ammoniumacetat pH 6,8	100	65

Die Stabilität von Nikkomycin Z/X ist in Lösungsmitteln mit saurem pH am größten.

2.7.4. UV-Spektren

In den Abbildungen 19-24 sind die UV-Spektren der Nikkomycine aufgeführt; aufgenommen in 0,1 N HCl (a) und 0,1 N NaOH (b).

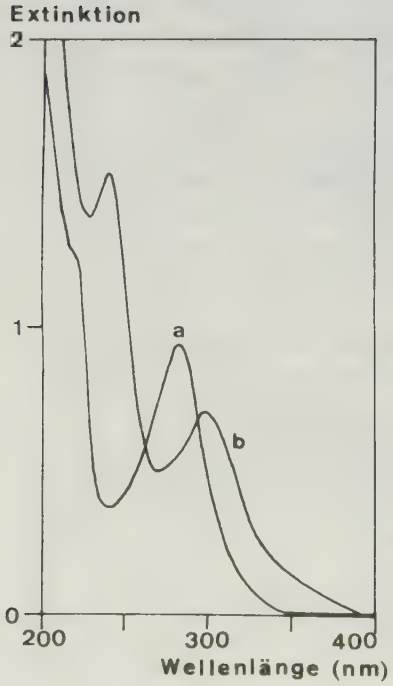


Abb. 19:
Nikkomycin B/B_x

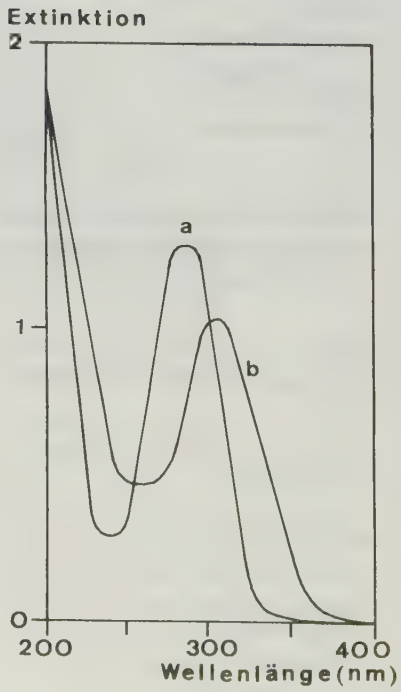


Abb. 20:
Nikkomycin C/C_x

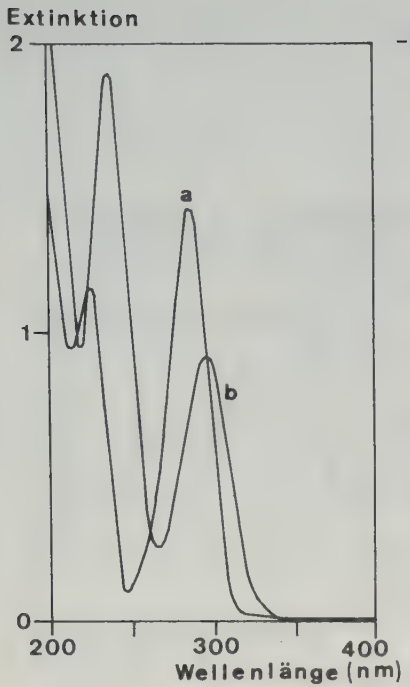


Abb. 21: Nikkomycin D

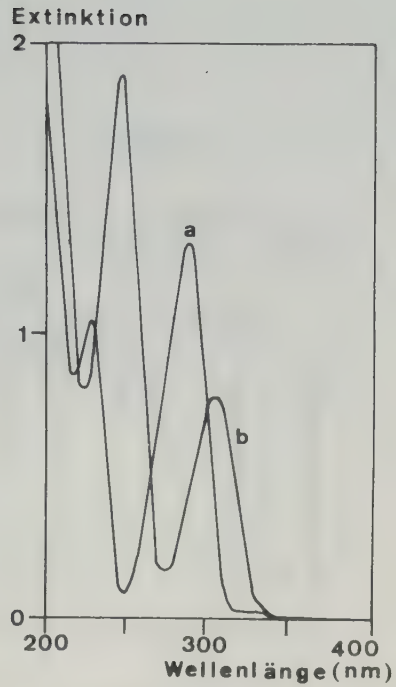


Abb. 22: Nikkomycin E

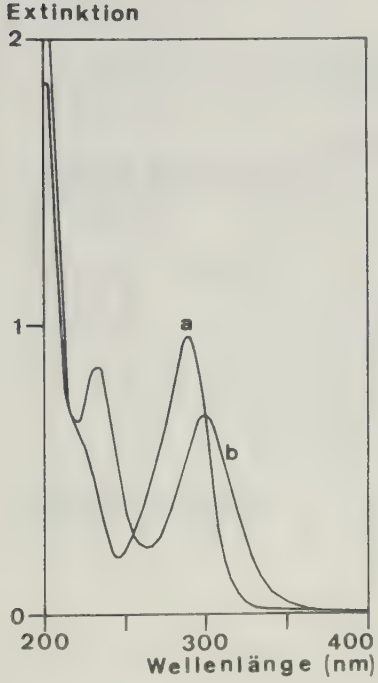


Abb. 23: Nikkomycin I

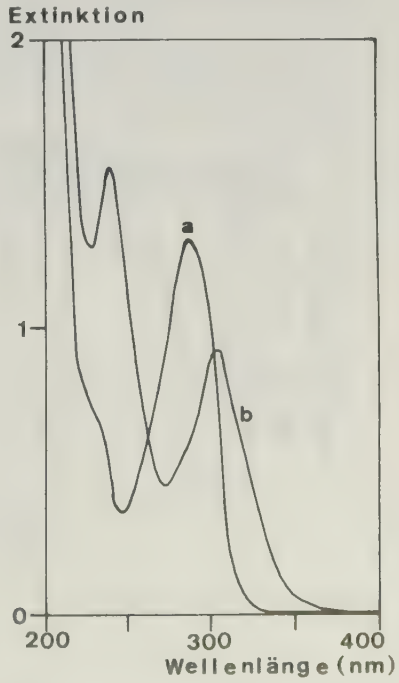


Abb. 24: Nikkomycin Z/X

2.7.5. IR-Spektren

Die Abbildungen 25-30 geben die IR-Spektren der Nikkomycine wieder.

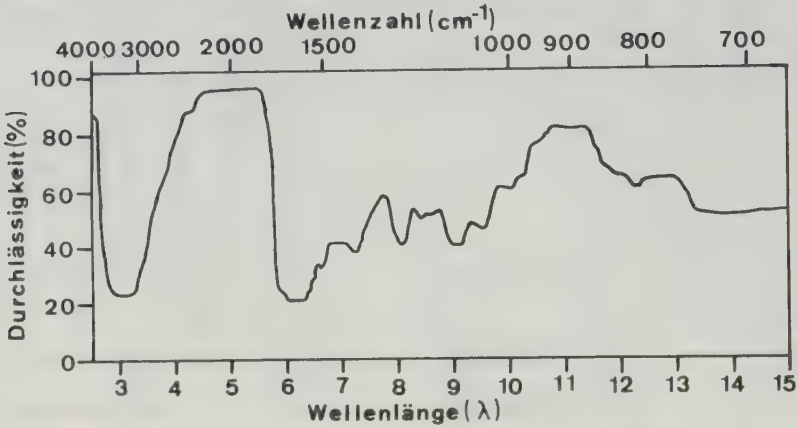


Abb. 25: Nikkomycin B/B_x

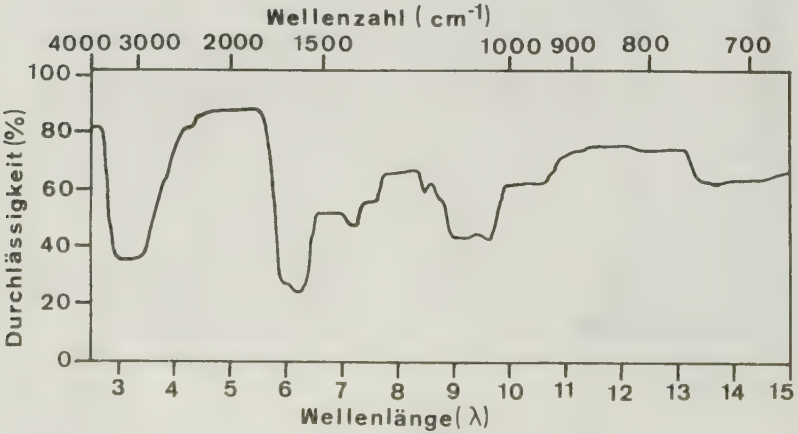


Abb. 26: Nikkomycin C/C_x

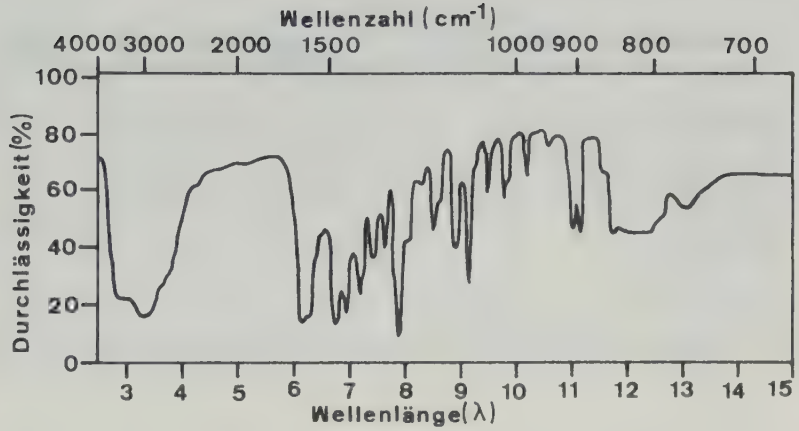


Abb. 27: Nikkomycin D

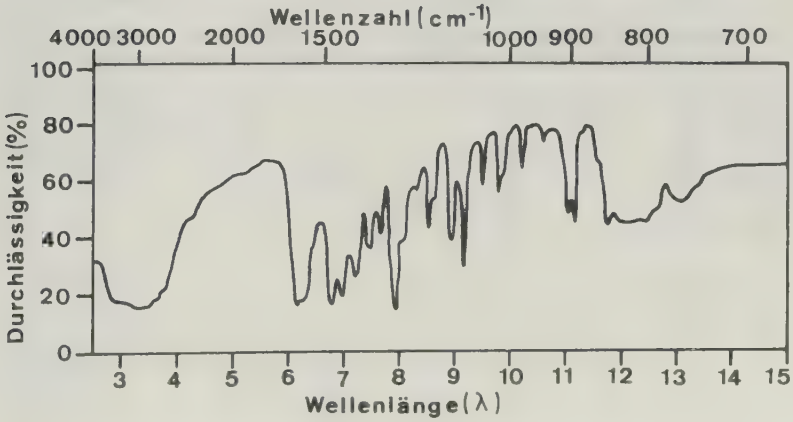


Abb. 28: Nikkomycin E

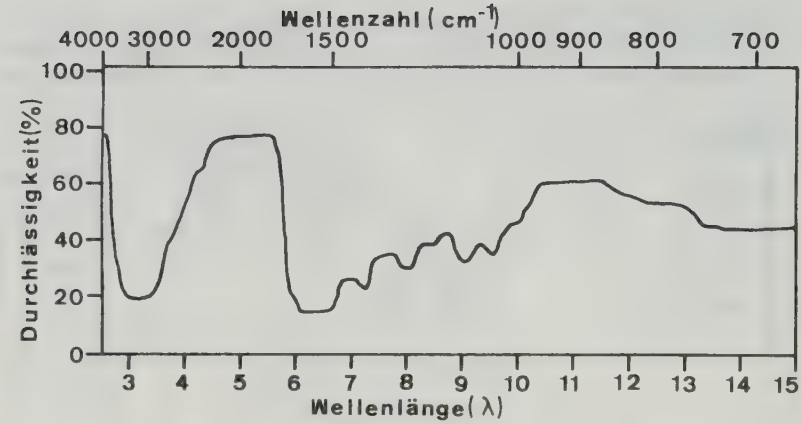


Abb. 29: Nikkomycin I

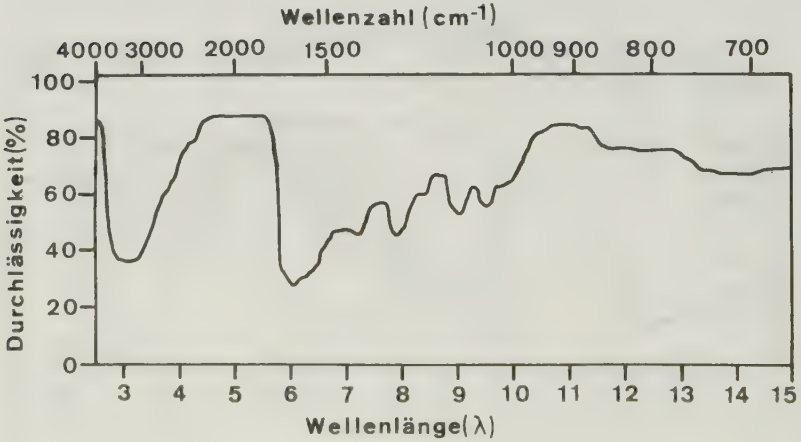


Abb. 30: Nikkomycin Z/X

2.8. Biologisches Verhalten

2.8.1. Wirkungsspektrum

Im Plattendiffusionstest wurde die antibiotische Wirkung der Nikkomycine gegen verschiedene Bakterien und Pilze untersucht. Das Ergebnis dieses Versuches geht aus Tabelle 25 hervor.

Tabelle 25: Wirkungsspektrum der Nikkomycine
T = Testanordnung (Methodenteil II.5.1-4)
- = nicht getestet

Testorganismus	Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)						T
	B/B_X	C/C_X	D	E	I	Z/X	
Bakterien:							
Bacillus subtilis	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.4
Clostridium pasteurianum	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.4
Escherichia coli	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.4
Pilze:							
Alternaria kikuchiana	3,12	>100	>100	>100	50	1,56	5.1
Aspergillus fumigatus	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.1
Botrytis cinerea	3,12	>100	>100	>100	12,5	3,12	5.2
Candida albicans	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.3
Formitropsis marginatus	-	>100	>100	>100	>100	>100	5.2
Fusarium solani	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.1

Tabelle 25: Fortsetzung

Testorganismus	Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)						T
	B/B_x	C/C_x	D	E	I	Z/X	
Heterobasidium annosum	-	>100	>100	>100	50	1,56	5.2
Lepiota pircera	-	>100	>100	>100	>100	6,25	5.2
Microsporum gyspeum	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.1
Mucor hiemalis (±)	0,78	>100	>100	>100	25	0,78	5.1
Mucor miehei	>100	>100	>100	>100	>100	50	5.1
Rhodotorula glutinis	-	>100	>100	>100	>100	6,25	5.2
Saccharomyces cerevisiae	>100	>100	>100	>100	>100	>100	5.3
Schizophyllum commune	-	>100	>100	>100	>100	>100	5.3
Trametes zonata	-	>100	>100	>100	12,5	3,12	5.2

2.8.2. Resistenz gegen das eigene Antibiotikum

Nikkomycin Z/X hemmt nicht nur die Chitinsynthese, sondern auch die RNS-Synthese und die Proteinsynthese (Höhne, 1974). Mit diesem Versuch sollte getestet werden, ob Streptomyces tendae gegen das von ihm gebildete Antibiotikum empfindlich ist. Das Ergebnis zeigte, daß sowohl das Wachstum als auch die Produktion bei Nikkomycinkonzentrationen von 0,05 g/l bis 0,8 g/l im Medium nicht beeinflußt werden.

IV. DISKUSSION

1. Optimierung

Eine entscheidende Rolle bei der Produktion der Nikkomycine spielt der pH-Wert. In sämtlichen Kolbenversuchen, in denen der pH-Wert im neutralen bzw. alkalischen Bereich verblieb, wurde nur eine niedrige Nikkomycinbildung festgestellt. Das gleiche Ergebnis zeigt sich in den Fermentationen X und XI, in denen ein ungewöhnlich starkes Wachstum mit einer schlechten Antibiotikaproduktion verbunden war.

Sämtliche Versuche zur Überprüfung von Stickstoffquellen hinsichtlich ihrer Eignung auf die Nikkomycinproduktion müssen in Zusammenhang mit dem pH-Wert des Kulturmediums gesehen werden. Ein Beispiel hierfür ist die Produktionssteigerung im Fermenter bei Verwendung von 2 % Hefeextrakt und einem konstanten pH von 5,5; im Kolbenversuch hingegen erfolgte ein Rückgang der Nikkomycinbildung bei gleichzeitigem Absinken des pH-Wertes in den alkalischen Bereich.

Die Verwendung von $CaCO_3$ als Puffer im Kolbenversuch blieb ohne Erfolg, da dadurch der pH-Wert im neutralen Bereich gehalten wurde.

Eine andere Möglichkeit, das Medium zu puffern, besteht in der Verwendung von Phosphatpuffern. Kolbenversuche mit Zusatz von Phosphationen zeigten aber eine gesteigerte Mycelproduktion bei gleichzeitigem Rückgang der Nikkomycinbildung. Es ist schon länger bekannt, daß der Sekundärmetabolismus engere Toleranzen für die Konzentration von anorganischem Phosphat aufweist als das Wachstum der Produktionszellen. Der Bereich von anorganischem Phosphat im Kulturmedium, der ein gutes Wachstum der Zellen ermöglicht, reicht von 0,3 - 500 mM. Die durchschnittlich niedrigste Menge, die zu einer maximalen Suppression des Sekundärprozesses führt, beträgt im Gegensatz dazu 10 mM (Martin, 1977).

In den meisten Fermentationen von Sekundärmetaboliten wer-

den die besten Produktmengen bei Phosphatkonzentrationen erhalten, die suboptimal für das vegetative Wachstum sind (Weinberg, 1974).

Komplexmedien enthalten aber eine beträchtliche Menge an Phosphat. Der Prozentsatz in Hefe- und Fleichextrakt beträgt z.B. zwischen 2 % und 4 % (Sykes, 1956), und ein solches Komplexmedium als Nährlösung enthält über 2,5 mM Phosphat. Durch Erhöhung der phosphathaltigen Medienbestandteile kann, ohne Realisierung dieser Sachlage, die kritische Phosphatgrenze überschritten werden, was sich in einer niedrigeren Antibiotikaproduktion äußert.

Für eine ausreichende pH-Pufferung im Schüttelkolben ist ein 1/15 m Phosphatpuffer nötig; bei diesen Konzentrationen sank die Nikkomycin-Produktion aber auf einen sehr niedrigen Level. Wie die Stabilitätsversuche gezeigt haben, ist die Stabilität der Nikkomycine in Phosphatpuffer sehr gering. Die Wirkung der Phosphatrepression und die geringe Stabilität in Phosphatpuffer addieren sich, was zu einer schlechten Produktion führt.

Suzuki et al. (1967) berichteten in ihrer Arbeit über die Inosinproduktion, daß lösliche Phosphatsalze, wie Kaliumphosphat, die Inosinbildung unterdrückten, sie wurde aber durch die Zugabe von unlöslichen Salzen, wie Calciumphosphat, stimuliert.

Die Verwendung von unlöslichen Calciumphosphaten erwies sich als ungeeignet, da diese ebenfalls zu einer Abnahme der Nikkomycinproduktion führten.

Hall und Hasall (1970) berichten, daß Kulturen von Streptomyces jamaicensis Monamycin bei 0,2 mM Phosphat sowie ein anderes, nicht damit verwandtes Antibiotikum, bei 0,6 mM Phosphat produzieren. Der Stamm TÜ 901 bildet nicht nur die Nikkomycine, sondern auch noch Ketomycin und Cyclohexenylglycin. Es wäre durchaus interessant, die Produktion und Variation dieser Sekundärmetaboliten unter Phosphateinfluß zu untersuchen.

Ein weiterer Parameter, der den Sekundärmetabolismus beeinflußt, ist die Inkubationstemperatur. Die Temperatur, die ein gutes Wachstum ermöglicht, überstreicht oft einen Bereich bis zu 25°C, wohingegen der Temperaturbereich, der eine gute Sekundärmetabolitenproduktion erlaubt, meist kleiner als 5°C ist.

Sekundärmetaboliten werden oft als eine Familie eng verwandter Substanzen gebildet und die Konzentrationsverhältnisse dieser Familienmitglieder sind temperaturabhängig. Das Verhältnis von Aflatoxin G_1:B_1 bei 20°C, 25°C und 30°C beträgt 3:1, 1:2 und 1:1 (Ciegler et al., 1966). In Aspergillus ochraceus Fermentationen wird bei 10-20°C die Penicillinsäure-Synthese favorisiert, wohingegen bei 28°C die Ochratoxin A-Produktion stimuliert wird (Ciegler, 1972).

Für die Nikkomycine läßt sich wahrscheinlich ebenfalls ein Einfluß der Temperatur auf die Produktion der einzelnen Komponenten voraussagen. Mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Temperaturversuch konnte dies leider noch nicht bewiesen werden, da zu diesem Zeitpunkt die HPLC-Trennmethode zum Nachweis der einzelnen Komponenten noch nicht entwickelt war.

Die Versuche zur Optimierung des Nährmediums zeigten, daß die Nährstoffkonzentrationen am Anfang der Fermentation nicht beliebig erhöht werden können. Es ist zu vermuten, daß die Produktion der Nikkomycine neben der C- und N-Quelle abhängig ist von den verfügbaren Aminosäuren, Vitaminen, Cofaktoren und Biosynthesevorstufen, die in den komplexen Bestandteilen der Nährlösung, dem Sojamehl und dem Hefeextrakt, enthalten sind. Eine Steigerung der Produktion scheint nur durch zusätzliches Feeding von Nährlösung während der Fermentation möglich zu sein. Mit Fermenter XIX gelang trotz Zugabe von Nährlösung nur die Stabilisierung eines konstanten Mycelgewichts, aber keine Produktionssteigerung. Wie Abbildung 4 zeigt, wird während der Fermentation der vorhandene Stickstoff nicht verbraucht. In der Feedinglösung war aber ebenfalls Stickstoff enthalten. Mar-

tin und Daniel (1974) berichten bei der Produktion von Polyen-Antibiotika, daß das Feeding von Stickstoff in Kombination mit Glucose ein kontinuierliches Wachstum und eine niedrigere Ausbeute zur Folge hatte. In weiteren Versuchen sollten nicht stickstoffhaltige Feedinglösungen in ihrer Wirkung auf die Nikkomycinproduktion untersucht werden.

Die Fermentationsbedingungen inclusive der Zusammensetzung der Nährlösung üben einen Einfluß auf die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Nikkomycinkomponenten aus. Allein das Vertauschen der Konzentrationen von Mannit und Stärke in Medium D führt zu einer unterschiedlichen Produktion von Nikkomycin I und H. Während vorwiegend Nikkomycin I bei höherer Mannitkonzentration gebildet wird, entsteht bei höherer Stärkekonzentration hauptsächlich Nikkomycin H. In den Abbildungen 31 und 32 sind HPLC-Diagramme aus den Kulturfiltraten dieser Fermentationen dargestellt.

Mit Hilfe der HPLC konnte eine weitere Komponente, bezeichnet als Nikkomycin K, im Kulturfiltrat entdeckt werden. Sie wird ebenfalls nur bei höheren Stärkekonzentrationen produziert und erreicht das Produktionsmaximum nach bereits 80 h, um dann während der weiteren Fermentationszeit wieder abgebaut zu werden. In Abbildung 33 ist das HPLC-Diagramm aus dem Kulturfiltrat einer entsprechenden Fermentation abgebildet. Bisher wurde noch kein Versuch zur Isolierung dieser Substanz unternommen.

Die Abhängigkeit der Produktion verschiedener Komponenten einer Antibiotika-Familie vom Nährmedium konnten auch Isono et al. (1967) bei den Polyoxinen feststellen. Sie benützten zur Produktion der Polyoxine C und H ein anderes Medium als zur Herstellung der übrigen Polyoxine.

Weitere Produktionssteigerungen sind vielleicht durch Zugabe von Vorstufen der Nikkomycinbiosynthese ins Nährmedium zu erreichen. Voraussetzung hierfür ist aber die Aufklärung der Biosynthese, wie sie bereits bei den Polyoxinen durchgeführt wurde (Isono et al., 1975; Funayama, Isono, 1975; Funayama, Isono, 1977; Isono et al., 1977). Untersuchungen

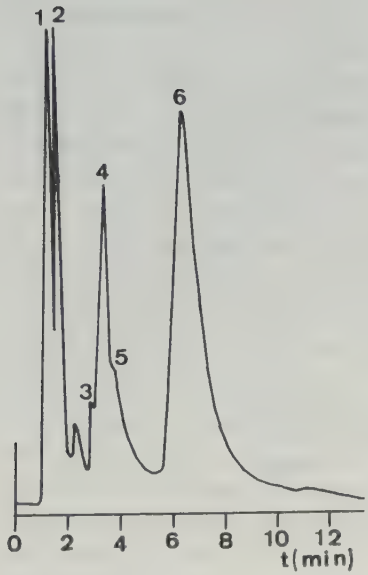


Abb. 31:

HPLC-Diagramm aus dem Kulturfiltrat einer Fermentation mit Medium D

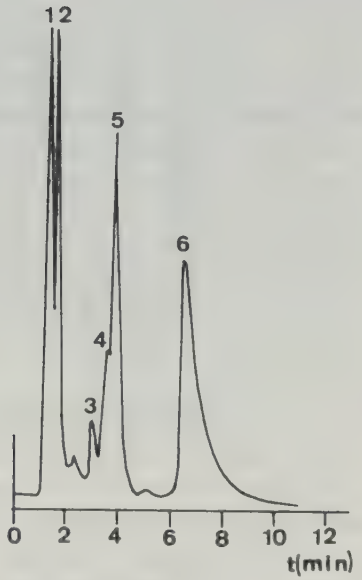


Abb. 32:

HPLC-Diagramm aus dem Kulturfiltrat einer Fermentation mit 1 % Mannit und 3 % Stärke

Legende zu Abbildung 31 und 32:
Peak 1: gelber Farbstoff
Peak 2: Nikkomycin C/C_x
Peak 3: Nikkomycin D
Peak 4: Nikkomycin I
Peak 5: Nikkomycin H
Peak 6: Nikkomycin Z/X

bei den Nikkomycinen mit dem Einbau von radioaktiv markiertem Uracil nach einer modifizierten Methode von Hori et al. (1975) zeigten, daß die Einbaurate von Uracil in die Nikkomycine äußerst gering war (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Produktionssteigerung mit Mutanten ist sicherlich zu erreichen, auch wenn dies nur mit einem großen Aufwand möglich ist. Kenntnisse der Biosynthese wären in diesem Fall ebenfalls von Vorteil, um Anhaltspunkte zu haben, in wel-

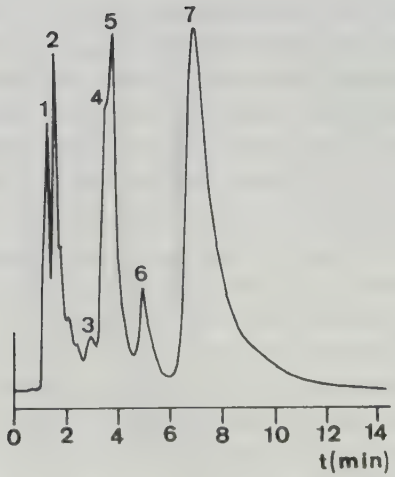


Abb. 33: HPLC-Diagramm aus dem Kulturfiltrat einer Nikkomycin K enthaltenden Fermentation
1: gelber Farbstoff
2: Nikkomycin C/C_x
3: Nikkomycin D
4: Nikkomycin I
5: Nikkomycin H
6: Nikkomycin K
7: Nikkomycin Z/X

chem Bereich des Stoffwechsels nach Mutanten gesucht werden soll.

Eine Stammoptimierung beim Kasugamycin-Produzenten Streptomyces kasugaensis wurde von Ishikawa et al. (1971) beschrieben. Dieser Test ist allerdings so aufwendig, daß er den Rahmen einer Dissertation, in der noch weitere Faktoren untersucht werden sollen, sprengen würde.

Scherr et al. (1966) berichten von einer Methode, in der Antimetaboliten von Fermentationsprodukten oder Antimetaboliten von Vorstufen solcher Produkte als selektives Agens für Mutanten benutzt werden können, die eine erhöhte Menge an Sekundärmetaboliten produzieren oder Veränderungen in der negativen Feed-Back-Kontrolle des Sekundärmetaboliten aufweisen.

2. Isolierung

Wie die Ergebnisse der Stabilitätsversuche beweisen, zeigt Nikkomycin Z/X bei 4°C eine entschieden bessere Stabilität als bei Raumtemperatur. Nur in sauren Lösungsmitteln ist das Stabilitätsverhalten auch bei Raumtemperatur befriedigend. Dies war überraschend, da in Essigsäure enthaltenden Laufmittelsystemen der Dünnschichchromatographie immer eine partielle Spaltung des Gesamtmoleküls auftritt. Dieser Unterschied kann nur durch die hohe Essigsäurekonzentration im Laufmittel erklärt werden, welche einer 16 %igen Lösung entspricht.

Die geringste Stabilität zeigt sich in Lösungsmitteln, deren pH-Bereich im neutralen bzw. alkalischen Bereich liegt. Besonders instabil ist Nikkomycin Z/X in 0,05 N Ammoniak. Diese Lösung wird aber auch zur Elution der Nikkomycine von der Dowex 50WX4-Säule benützt. Die Aufarbeitungsverluste in diesem Schritt sind mit 25 % ziemlich hoch. Die hohen Aktivitätsverluste könnten zum einen durch die Verwendung anderer Materialien, zum anderen durch ein modifiziertes Elutionsverfahren vermieden werden.

Dowex 50WX4 durch Absorberharze von Typ XAD 2, XAD 4, XAD 8 und XAD 12 zu ersetzen, waren von keinem Erfolg gekrönt, denn im Durchlauf und Waschwasser fanden sich zwischen 20 und 60 % der eingesetzten Aktivität.

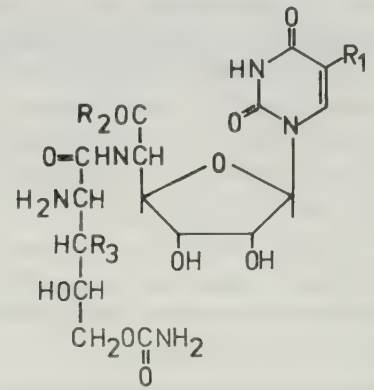
Andere Elutionsmittel sollten die Vorteile des Ammoniaks besitzen (leicht flüchtig, geringes Elutionsvolumen), aber nicht dessen Nachteile (geringe Stabilität der Nikkomycine). Die Verwendung der flüchtigen Puffer Ammoniumacetat, Ammoniumcarbonat und Natriumacetat führte zu keinem besseren Ergebnis, da entweder große Elutionsvolumen benötigt wurden oder nur ein kleiner Teil der eingesetzten Aktivität eluiert werden konnte.

Im Durchlauf und Waschwasser der IRC-84 bzw. IRC-50 Säulen befanden sich immer ein Teil der Nikkomycine I und Z/X. Die Variation der Einsatzform des Ionenaustauschers (Na^+-

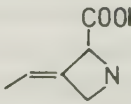
Form, H^+-Form) oder die pH-Änderungen des Auftragmaterials (pH 4 bis pH 10) führten in keinem Fall zu einer Reduzierung der Nikkomycine I und Z/X im Durchlauf. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann nicht gegeben werden.

Die Aufarbeitung für die Nikkomycine C/C_x und B/B_x wurde nicht nach quantitativen, sondern nach qualitativen Gesichtspunkten durchgeführt. Im Aufarbeitungsweg dieser Substanzen sammelt sich der größte Teil der Verunreinigungen an. Durch eine Modifizierung der Aufarbeitung, speziell für die Isolierung dieser Substanzen, ließen sich wahrscheinlich größere Ausbeuten erhalten.

Bei einem Vergleich der Strukturformeln der Polyoxine mit den Nikkomycinen fallen folgende Unterschiede auf:



$R_1 = H, CH_3, CH_2OH, COOH$

$R_2 = OH,$ 

$R_3 = H, OH$

Abb. 34: Allgemeine Strukturformel der Polyoxine (Isono et al., 1969; Hori et al., 1974).

1) Sämtliche Polyoxine enthalten einen unsubstituierten oder substituierten Uracilring (R_1).

   Die Nikkomycine enthalten entweder einen unsubstituierten Uracilring oder einen 4-Formyl-4-imidazolin-2-on-Ring. Nikkomycine mit den bei den Polyoxinen auftretenden Substituenten am Uracilring konnten nicht gefunden werden.

   Eine Umlagerung des Uracilringes in den 4-Formyl-4-imidazolin-2-on-Ring während der Aufarbeitung ist ausgeschlossen. Sowohl mit der Dimedon-Reaktion als auch mit der analytischen HPLC (Hagenmaier et al., 1979) konnte nachgewiesen werden, daß Nikkomycin Z und X im ursprünglichen Kulturfiltrat im gleichen Verhältnis vorliegen wie nach der Aufarbeitung.

2) Die Polyoxine A, F, H, I und K enthalten an der 5-Amino-5-desoxyuronsäure, über eine Peptidbindung mit der Carboxylgruppe verknüpft, die Polyoxin-Säure (3-Äthylen-L-acetidin-2-carbonsäure) (R_2).

   Nikkomycine mit Änderungen in diesem Bereich ließen sich bisher ebenfalls noch nicht isolieren.

3) Veränderungen im Aminosäureteil des Moleküls treten sowohl bei den Polyoxinen als auch bei den Nikkomycinen auf. Die Variation bei den Polyoxinen besteht aus dem Austausch eines Wasserstoffatoms mit einer Hydroxylgruppe (R_3).

   Bei den Nikkomycinen wird der Pyridinring durch einen Benzolring ersetzt.

Neben der Isolierung der Hydroxy-Pyridinaminosäure (Nikkomycin D) gelang auch die Isolierung einer Pyridinaminosäure, der die Hydroxylgruppe fehlt (Nikkomycin E). Trotz intensiver Suche ist es nicht gelungen, ein Nikkomycin zu isolieren, das sowohl den Nucleosidbestandteil als auch die Pyridinaminosäure enthält. Die Möglichkeit, daß Nikkomycin E

ein Artefact der Aufarbeitung ist, kann bei den angewendeten Bedingungen als gering eingeschätzt werden.

Die Nikkomycine D und E erweisen sich als inaktiv gegen sämtliche getesteten Mikroorganismen. Dies könnte bedingt sein durch das Fehlen eines spezifischen Transportsystems für diese Verbindungen. Gibt es kein Transportsystem für diese Substanzen, erweist sich die Zellmembran als eine ausgezeichnete Barriere. Durch Verknüpfen dieser Moleküle mit einem Peptid sollte es möglich sein, über das Oligopeptidtransportsystem diese Verbindungen in die Zelle zu transportieren. Nach Spaltung in der Zelle könnte die freigewordene Substanz möglicherweise als Antagonist zu natürlichen Substraten ihre Wirkung entfalten. Als Beispiel für diese Möglichkeit kann Phosphinotricyl-Alanyl-Alanin gelten (Bayer et al., 1972).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Produktion der Nikkomycine wurde durch Variation der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen untersucht, ebenso wurde der Einfluß verschiedener Mineralsalze getestet.

Änderungen der äußeren Bedingungen üben einen Einfluß auf die Nikkomycinproduktion aus.

Die Bedingungen im 20 l-Fermenter wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Nikkomycinbildung optimiert.

Variationen im Nährmedium führen zu Veränderungen in den Konzentrationsverhältnissen der einzelnen Nikkomycinkomponenten.

Die Optimierung der Nikkomycinproduktion führte zu einer Steigerung der Gesamtaktivität im Plattendiffusionstest auf 1,9 g/l im Fermenter und auf 2,1 g/l im Schüttelkolben.

Die Reinigung und Isolierung von Nikkomycin Z/X wurde optimiert. Die Ausbeute an Reinsubstanz steigerte sich dadurch auf 25 %.

Neben dem bereits bekannten Nikkomycin Z/X-Gemisch konnten weitere Vertreter der Nikkomycingruppe, die Nikkomycine C/C_x, B/B_x, D, E und I, isoliert werden.

Zusätzlich konnten mit Hilfe der HPLC im Kulturfiltrat zwei weitere Komponenten, bezeichnet als Nikkomycin K und H, nachgewiesen werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, N.G. and LADD, S.F.C.: Separation of nucleotides, nucleosides, and bases from ribonucleic acid on Dowex-1X8. Biochim. Biophys. Acta 55, 275-276 (1962)

AUTERHOFF, H. und LOHMANN, V.: Die Perjodatreaktion in der pharmazeutischen Analyse. Deutsche Apothekerzeitung 40, 904-905 (1957)

BARMAN, T.E.: Enzym Handbook. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1969)

BARTHOLOMEW, W.H.: Scale up of Submerged Fermentations. Adv. Appl. Microbiol. 2, 289-300 (1960)

BAYER AG: Offenlegungsschrift 2537028 beim Deutschen Patentamt (1977)

BAYER, E., GUGEL, K.H., HÄGELE, K., HAGENMAIER, H., JESSIPOW, S., KÖNIG, W.A. und ZÄHNER, H.: Phosphinothricin und Phosphinotricyl-Alanyl-Alanin, Helv. Chim. Acta 55, 224-239 (1972)

BÖRNER, H.: Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (1975)

BRIAN, P.W.: Griseofulvin. Trans. Br. mycol. Soc. 43, 1-13 (1960)

BRILLINGER, G.U.: Chitin synthase from fungi, a test model for substances with insecticidal properties. Arch. Microbiol., in press, 1979

CARTER, C.E.: Partial Purification of a Non-phosphorylytic Uridine Nucleosidase from Yeast. J. Amer. Chem. Soc. 73, 1508-1512 (1951)

CENNANO, C., BOLL, M. and HOLZER, H.: Über Treonindehydratase aus Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Zeitschrift 340, 125-145 (1964)

CIEGLER, A.: Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the Aspergillus ochraceus group. Can. J. Microbiol. 18, 631-636 (1972)

CIEGLER, A., PETERSON, R.E., LAGODA, A.A. and HALL, H.H.: Aflatoxin production and degradation by Aspergillus flavus in 20 l-fermentors. Appl. Microbiol. 14, 826-833 (1966)

CRAMPTON, C.F., FRANKEL, F.R., BENSON, A.M. and WADE, A.: Procedures for the Analysis of Purines and Pyrimidines by Elution from Columns of Sulfonated polystyrene with Buffers of pH 4. Anal. Biochem. 1, 249-262 (1960)

DÄHN, U.: Reinigung und Untersuchungen zur Strukturaufklärung von 3 Antibiotika. Dissertation Universität Tübingen (1975)

DÄHN, U., HAGENMAIER, H., HÖHNE, H., KÖNIG, W.A., WOLF, G. und ZÄHNER, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen. Arch. Mikrobiol. 107, 143-160 (1976)

DAVIS, B.D. and MINGIOLI, E.S.: Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B_{12}. J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950)

ENDO, A., KAKIKI, K. and MISATO, T.: Mechanism of action of the antifungal agent of polyoxin D. J. Bacteriol. 104, 189-196 (1970)

FIEDLER, H.P. and DEHLER, W.: Antibiotic Quantitation in Fermentation Process by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In Vorbereitung (1979)

FUNAYAMA, S. and ISONO, K.: Biosynthesis of the Polyoxins, Nucleoside Peptide Antibiotics: Glutamate as an origin of 2-amino-2-deoxy-L-xylonic acid (polyoxamic acid). Biochemistry 14, 5568-5572 (1975)

FUNAYAMA, S. and ISONO, K.: Biosynthesis of the Polyoxins, Nucleoside Peptide Antibiotics: Biosynthetic Pathway for 5-o-Carbomoyl-2-amino-2-deoxy-L-xylonic Acid (Carbamoyl-polyoxamic Acid). Biochemistry 16, 3121-3127 (1977)

GOODAY, G.W., DE ROUSSET-HALL, A. and HUNSLEY, D.: Effect of Polyoxin D on Chitin Synthesis in Coprinus cinereus. Trans. Br. mycol. Soc. 67(2), 193-200 (1976)

HAGENMAIER, H., KECKEISEN, A., ZÄHNER, H. und KÖNIG, W.A.: Strukturaufklärung des Nukleosidantibiotikums Nikkomycin X. In Vorbereitung (1979)

HALL, M.J. and HASSALL, C.H.: Production of the monamycins, novel depsipeptide antibiotics. Appl. Microbiol. 19, 109-112 (1970)

HASENBÖHLER, A.: Instrumentierung von Fermentationsanlagen. Dissertation Universität Tübingen (1978)

HOCKENHULL, D.J.D.: The Fermentation Pilot Plant and Its Aims. Adv. Appl. Microbiol. 19, 187-208 (1975)

HORI, M., EGUCHI, J., KAKIKI, K. and MISATO, T.: Studies on the Mode of Action of Polyoxins, Part VI. J. Antibiot. 27 A, 260-266 (1974 b)

HORI, M., KAKIKI, K. and MISATO, T.: Preparation of radioactive polyoxins A, B, C, and J. J. Antibiot. 28 A, 237-239 (1975)

HÖHNE, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese. Dissertation Universität Tübingen (1974)

HÜTTER, R., KELLER-SCHIERLEIN, W., NUESCH, J. und ZÄHNER, H.: Scopamine. Arch. Mikrobiol. 51, 1-8 (1965)

ICHIKAWA, R., DATE, M., ISHIKURA, T. and OZAKI, A.: Improvement of Kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. Folia Microbiol. 16, 218-234 (1971)

ISHIYAMA, T., HARA, I., MATSUOKA, M., SAITO, K., SHIMADA, S., IZAWA, R., HASHIMOTO, T., HAMADA, M., OKAMY, Y., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H.: Studies on the Preventive Effect of Kasugamycin on Rice blast. J. antibiot. 18 A, 115-119 (1965)

ISONO, K.: Persönliche Mitteilung (1977)

ISONO, K., ASAHI, K. and SUZUKI, S.: Studies on Polyoxins, Antifungal Antibiotics XIII. The Structure of Polyoxins. J. Amer. Chem. Soc. 91, 7490-7505 (1969)

ISONO, K., FUNAYAMA, S. and SUHADOLNIK, R.J.: Biosynthesis of the Polyoxins, Nucleoside Peptide Antibiotics: A new metabolic role for L-isoleucine as a precursor for 3-ethylidene-L-azetidine-2-carboxylic acid (polyoximic acid). Biochemistry 14, 2992-2995 (1975)

ISONO, K., KOBINATA, K. and SUZUKI, S.: Isolation and characterisation of polyoxins J, K and L. New components of polyoxin complex. Agr. Biol. Chem. 32, 792-793 (1968)

ISONO, K., NAGATSU, J., KAWASHIMA, Y. and SUZUKI, S.: Studies on Polyoxins, antifungal antibiotics. Part 1. Agr. Biol. Chem. 29, 848-854 (1965)

ISONO, K., NAGATSU, J., KOBINATA, K., SASAKI, K. and SUZUKI, S.: Studies on Polyoxins, Antifungal Antibiotics, Part V. Agr. Biol. Chem. 31, 190-199 (1967)

ISONO, K., SATO, T., HIRASAWA, K. and FUNAYAMA, S.: Biosynthesis of the polyoxins, nucleoside peptide antibiotics: formation of the nucleoside sceleton. Nucleic Acid Research 91-94 (1977)

IWASA, T., HIGASHIDE, E., YAMAMOTO, H. and SHIBATA, M.: Studies on Validamycins, New Antibiotics II. Production and Biological Properties of Validamycins A and B. J. Antibiot. 24 A, 107-113 (1971 a)

KAPPNER, M., HASENBÖHLER, A. und ZÄHNER, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 166. Mitteilung. Optimierung der Desferri-Ferricrocinbildung bei Aspergillus viridi-nutans Ducker & Thrower. Arch. Microbiol. 115, 323-331 (1977)

KIRST, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation Universität Tübingen (1971)

KLISIEWICZ, J.M. and POUND, G.S.: Studies on control of black rot of crucifers by treating seeds with antibiotic. Phytopathology 51, 495-500 (1961)

KÖNIG, W.A.: Persönliche Mitteilung (1977)

KÖNIG, W.A., HAGENMAIER, H. und DÄHN, U.: Massenspektrometrische Identifizierung von 3-Cyclohexenylglycin im Kulturfiltrat von Streptomyces tendae. Z. Naturforsch. 30 b, 626-628 (1975)

LANGHÄRIG, J.: Aufstellung eines Produktionsspektrums von TÜ 901 - Streptomyces tendae Ettlinger. Diplomarbeit Universität Tübingen (1979)

LENIN, A.J. and FORD, J.H.: Isocycloheximid. J. org. Chem. 25, 244-253 (1960)

MAEHR, H. and SCHAFFNER, C.: The Separation and Differentiation of the Gentamicin Complex. J. Chromat. 30, 572-578 (1967)

MALAPRADE, M.L.: Action des polyalcools sur l'acide periodique. Application analytique. Bull. soc. chim. 43, 683-686 (1928)

MARTIN, J.F.: Control of Antibiotic Synthesis by Phosphate. Adv. Biochem. Bioeng. 6, 105-127 (1977)

MARTIN, J.F. and MC DANIEL, L.E.: The Submerged Culture Production of the Polyene Antifungal Antibiotics Candidin and Candihexin. Develop. Ind. Microbiol. 15, 324-337 (1974)

MISATO, T., ISHOII, I., ASAKAWA, M., OKIMOTO, Y. and FUKUNAGA, K.: Antibiotics as protectant fungicides against rice blast II. The therapeutic action of blasticidin S. Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 24, 302-306 (1959)

MISATO, T., KO, K. and YAMAGUCHI, I.: Use of Antibiotics in Agriculture. Adv. Appl. Microbiol. 21, 53-88 (1977)

MITCHELL, J.W., ZAUMEYER, W.J. and PRESTON, W.H.: Absorption and translocation of Streptomycine by bean plants and its effect on the halo and common blight organisms. Phytopathology 44, 25-30 (1954)

MÜLLER, A.: Siderochrome aus Mikroorganismen. Dissertation Universität Tübingen (1968)

OXOID HANDBUCH: 2. Auflage (1972)

PERLMAN, D. and MARTIN, C.K.A.: Antibiotics by the thousand: An overview from the U.S.A. in: Antibiotics and Antibiosis in Agriculture, ed. M. Woodbine, Butterworths, London-Boston (1977)

PORALLA, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolidantibiotika. Dissertation Universität Tübingen (1967)

SCHERR, G.H. and RAFELSON Jr., M.E.: Antimetabolites as Selektive Agents for the Isolation of Biochemical Mutants. Develop. Ind. Microbiol. 7, 97-103 (1966)

SNYDER, L.R. and KIRKLAND, J.J.: Introduction to modern liquid chromatography. New York - London - Syndey - Toronto: John Wiley & Sons (1974)

SUZUKI, T., NOGAMI, I., KITAHARA, Y., ISHIKAWA, M. and YONEDA, M.: Studies on the accumulation of inosin by Bacillus pumilus. Ann. Rept. Takeda Res. Lab. 26, 126-137 (1967)

SYKES, G.: Constituents of Bacteriological Culture Media. Cambridge Univ. Press, England (1956)

WEINBERG, E.D.: Secondary Metabolism: Control by Temperature and Inorganic Phosphate. Develop. Ind. Microbiol. 15, 70-81 (1974)

WOLF, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30S-Untereinheit. Dissertation Universität Tübingen (1971)

YOUNG, F.M. and WOOD, B.J.B.: Composition of Soybeans from Varies Sources. Adv. Appl. Microbiol. 17, 157-194 (1974)

Lebenslauf

01.02.1949	geboren in Höhn (jetzt Neustadt) bei Coburg
1955-1960	Volksschule Dörfles-Esbach
1960-1969	Gymnasium Ernestinum, Coburg
28.06.1969	Reifeprüfung
01.07.1969-31.12.1970	Bundeswehr
ab 15.10.1970	beurlaubt zum Studium der Biologie an der Universität Würzburg
30.03.1973	Diplomvorprüfung in Biologie an der Universität Würzburg
ab SS 1973	Biologiestudium an der Universität Tübingen
14.04.1976	Diplomhauptprüfung in Biologie
	anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, unter Anleitung von Prof. Dr. H. Zähner

Meine akademischen Lehrer waren:

In Würzburg: U. Buschbom, M. Ehrenberg, R. Eicher, D. Fuldner, W. Geick, K. Gößwald, O. Götz, F. Heran, W. Hink, K. Horstmann, S. Hünig, W. Jeschke, M. Kandeler, L. Kappen, K. Kerth, G. Kneitz, G. Krause, G. Kühnen, G. Landwehr, M. Lange, W. Paarmann, A. Roedig, P. Röseler, H. Schmidbaur, M. Schmidt, L. Schneider, W. Simonis, F. Ullerich, W. Urbach, G. Witt, T. Wohlfarth.

In Tübingen: K. Altendorf, E. Bayer, V. Braun, W. Busch, H. Diekmann, D. Dütting, U. Feine, L. Flohé, J. Guglielmi, K. Handtke, K. Hartmann, V. Hemleben, U. Henning, E. Kallee, W. Löffler, H. Metzner, H. Pape, K. Poralla, H. Probst, E. Sander, W. Seyffert, D. Sperlich, H. Stegmann, H. Suhr, G. Weitzel, U. Weser, K. Wöhrmann, H. Zähner, K. Zeller.